



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

**Evaluación del potencial fermentativo de  
microorganismos aislados a partir de heces de coatí de  
cola anillada (*Nasua nasua*) para su aplicación en  
procesos fermentativos tecnológicos**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**AUTOR**

Jimmy Joshua PÉREZ ESCALANTE

**ASESORES**

Dra. María Elena SALAZAR SALVATIERRA

Dr. Waldir Desiderio ESTELA ESCALANTE

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Pérez, J. Evaluación del potencial fermentativo de microorganismos aislados a partir de heces de coatí de cola anillada (*Nasua nasua*) para su aplicación en procesos fermentativos tecnológicos [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2019.

---



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado  
Dirección General de Biblioteca y Publicaciones

Dirección del Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"



## **Hoja de metadatos complementarios**

Código ORCID del autor (dato opcional): <https://orcid.org/0000-0003-3339-554X>

Código ORCID del asesor o asesores (dato obligatorio):

<https://orcid.org/0000-0002-8917-7472>      <https://orcid.org/0000-0002-5661-4752>

DNI del autor: 73242650

Grupo de investigación: BIOFER

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

**INNÓVATE PERÚ**

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y/o coordenadas geográficas:

Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM (12°03'30"S 77°05'00"O)

Año o rango de años que la investigación abarcó: 2018-2019



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Decanato**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**"Evaluación del potencial fermentativo de microorganismos aislados a partir de heces de coatí de cola anillada (*Nasua nasua*) para su aplicación en procesos fermentativos tecnológicos"**

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

**JIMY JOSHUA PÉREZ ESCALANTE**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

*Dieciocho (18) Sobresaliente*

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 13 de diciembre de 2019.

Dra. Gladys Constanza Arias Arroyo  
Presidenta

Dra. Yadira Fernández Jeri  
Miembro

Mg. Celia Bertha Vargas de la Cruz  
Miembro

Q.F. José Fidel Jáuregui Maldonado  
Miembro

**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**



# ÍNDICE

RESUMEN .....	viii
SUMMARY .....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS .....	2
I. Objetivo general .....	2
II. Objetivos específicos .....	2
III. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1. Generalidades sobre el coatí de cola anillada ( <i>Nasua nasua</i> ) .....	4
3.1.1. Clasificación taxonómica del coatí de cola anillada. ....	4
3.1.2. Hábitat .....	5
3.1.3. Alimentación .....	5
3.1.4. Sanidad .....	6
3.1.5. Importancia.....	7
3.2. CAFÉ.....	8
3.2.1. Generalidades sobre el café .....	8
3.2.2. Composición química del café .....	9
3.2.3. Compuestos volátiles en el café .....	10
3.2.4. Microorganismos comunes presentes durante la fermentación de café .....	11
3.3. MICROFLORA AISLADA A PARTIR DE HECES DE ANIMALES .....	12
3.3.1 Identificación genética de microorganismos .....	13
3.4. FERMENTACIÓN MICROBIANA.....	14
3.4.1. Fermentación de alimentos .....	14
3.4.2. Fermentación ácido láctica.....	15
3.4.3. Fermentación por levaduras no- <i>Saccharomyces</i> .....	16
IV. METODOLOGÍA .....	17
4.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA.....	18
4.2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS .....	18
4.2.1. Aislamiento de levaduras .....	19
4.2.2. Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) .....	19
4.3. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	19
4.3.1. Identificación preliminar.....	19
4.4. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA .....	20
4.4.1. Test Catalasa .....	20
4.4.2. Asimilación de compuestos químicos .....	21
4.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR .....	23
4.5.1. Preparación de muestras .....	23

4.5.2.	Identificación mediante 16S y 26S ARNr .....	23
<b>4.6.</b>	<b>EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO .....</b>	<b>24</b>
<b>4.7.</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA DE MICROORGANISMOS .....</b>	<b>25</b>
4.7.1.	Preparación de inóculo.....	25
4.7.2.	Fermentaciones con cultivos puros.....	25
4.7.3.	Fermentaciones con cultivos mixtos .....	26
<b>4.8.</b>	<b>ANÁLISIS QUÍMICO.....</b>	<b>27</b>
4.8.1.	Determinación de azúcares reductores .....	27
4.8.2.	Determinación de ácido láctico .....	27
4.8.3.	Determinación de compuestos volátiles de importancia sensorial .....	28
<b>4.9.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>28</b>
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1.</b>	<b>AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS .....</b>	<b>30</b>
5.1.1	Aislamiento de levaduras .....	30
5.1.2	Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) .....	31
<b>5.2</b>	<b>IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....</b>	<b>31</b>
5.2.1	Identificación presuntiva.....	32
A.	Análisis morfológico de levaduras.....	32
B.	Tinción Gram y evaluación morfológica de bacterias ácido lácticas .....	32
5.2.2	Identificación bioquímica .....	33
A.	Actividad catalasa .....	33
B.	Ensayos de asimilación de compuestos químicos.....	34
5.2.3	Identificación molecular.....	36
<b>5.3</b>	<b>CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS.....</b>	<b>37</b>
5.3.1	Crecimiento de levaduras.....	37
5.3.2	Crecimiento de bacterias ácido lácticas.....	38
<b>5.4</b>	<b>ACTIVIDAD FERMENTATIVA DE MICROORGANISMOS .....</b>	<b>39</b>
5.4.1	Fermentaciones con cultivos puros de levaduras .....	39
5.4.2	Fermentaciones con cultivos puros de bacterias ácido lácticas .....	41
5.4.3	Fermentaciones con cultivos mixtos .....	44
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>VIII.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>63</b>
<b>X.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>74</b>

## ABREVIATURAS

m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
ppb	Partes por billón
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosin trifosfato
v/v	Volumen sobre volumen
mL	Mililitro
p/v	Peso sobre volumen
°C	Grados centígrados
h	Horas
DAF	Días después de la floración
mg/L	Miligramo sobre litro
g/L	Gramos litro
u/L	Microgramos sobre litro
rpm	Revoluciones sobre minuto
μ	Tasa de crecimiento específico.
pH	Potencial de hidrógeno.
ppm	Partes por millón
uL	Microlitros
nm	nanómetros
N	normalidad
mL/min	mililitros sobre minuto
n. d	no diferenciado



La presente tesis de pregrado ha sido financiada enteramente con fondos provenientes de INNOVATE PERÚ, Código de Proyecto: PITEI-7-P-127-034-17 y Convenio N° 009-INNOVATEPERU-PITEI-2018.

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo central evaluar el potencial fermentativo de microorganismos aislados a partir de heces de coatí de cola anillada (*Nasua nasua*), para su aplicación en procesos tecnológicos. Para ello se aislaron microorganismos empleando medios de cultivo selectivos tales como MRS-V y OGYE, luego se identificaron bioquímicamente utilizando Kits API (ID 32C y 50CHL) y molecularmente mediante secuenciamiento genético 16S y 26S ARNr, una vez identificados fueron estudiados como cultivos puros y mixtos utilizando medios sintéticos. Se ha evaluado la cinética de crecimiento, consumo de azúcares, pH, ácido láctico y producción de compuestos volátiles de importancia sensorial. Se identificaron las siguientes levaduras *Debaryomyces hansenii*, *Pichia kluyveri* y *Pichia krudiavzevii* y bacterias lácticas que incluyeron *Enterococcus thailandicus*, *Weissella paramesenteroides* y *Weissella cibaria*. Los cultivos en medio sintético mostraron que, las mayores velocidades específicas de crecimiento fueron para las cepas de *Pichia kluyveri* ( $0.140\text{ h}^{-1}$ ) y *Pichia krudiavzevii* ( $0.128\text{ h}^{-1}$ ), en levaduras, así como *Weissella paramesenteroides* ( $0.161\text{ h}^{-1}$ ) y *Weissella cibaria* ( $0.137\text{ h}^{-1}$ ) en bacterias lácticas. Los resultados mostraron una mayor disminución de pH en cultivos con las cepas *P. kluyveri* y *P. krudiavzevii* el cual estuvo correlacionado con el consumo de azúcar. Con respecto a las bacterias lácticas, *Weissella paramesenteroides* mostró un consumo de azúcar correlacionado con la producción de ácido láctico y el descenso de pH. Experimentos con cultivos puros mostraron la producción de alcohol isoteramilico por *P. kluyveri* y etil acetato por las tres cepas de levadura. Con respecto a cultivos mixtos, los co-cultivos con *P. kluyveri*/*W. paramesenteroides*, *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii* y *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria* produjeron alcoholes superiores y ésteres. Tecnológicamente las cepas de *Pichia kluyveri*, *Pichia krudiavzevii*, *Weissella paramesenteroides* y *Weissella cibaria* presentan interesantes características fermentativas que potencialmente podrían explotarse en bioprocesos.

**Palabras clave:** *Nasua nasua*, fermentación de café, heces de coatí, levaduras, bacterias lácticas.

## SUMMARY

The aim of this research was to evaluate the fermentative behavior of microorganisms isolated from feces of ring-tailed coati (*Nasua nasua*) for application in technological processes. Microorganisms were isolated using different selective media such as MRS-V and OGYE, followed by biochemical identification using API Kits (ID 32C and 50CHL) and molecular tools such as 16S and 26S rARN sequencing. Once identified, microorganisms were studied either as pure or mixed cultures. Evaluation included: growth kinetics, sugar consumption, pH variation and production of chemical compounds. It was identified yeast strains such as *Debaryomyces hansenii*, *Pichia kluyveri* and *Pichia krudiavzevii* and lactic acid bacteria such as *Enterococcus thailandicus*, *Weissella paramesenteroides* and *Weissella cibaria*. Cultivation in synthetic media showed *Pichia kluyveri* and *Pichia krudiavzevii* with the highest specific growth rate ( $0.140\text{ h}^{-1}$  and  $0.128\text{ h}^{-1}$  respectively), meanwhile, *Weissella paramesenteroides* ( $0.161\text{ h}^{-1}$ ) and *Weissella cibaria* ( $0.137\text{ h}^{-1}$ ) were the lactic acid bacteria with the highest values. In addition, the results showed a greater pH decrease with *P. kluyveri* and *P. krudiavzevii* which were correlated with the sugar consumption. Regarding to lactic bacteria, *Weissella paramesenteroides* showed a sugar consumption correlated with the production of lactic acid and the pH decrease. Experiments with pure cultures showed the production of isoteramiliic alcohol by *P. kluyveri* and, ethyl acetate by all yeast strains. With respect to mixed cultures, co-cultures of *P. kluyveri*/*W. paramesenteroides*, *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. Krudiavzevii* and *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides* /*W. cibaria* showed production of higher alcohols and esters. From the technological pint of view, strains of *Pichia kluyveri*, *Pichia krudiavzevii*, *Weissella paramesenteroides* and *Weissella cibaria* showed interesting fermentative characteristics that could potentially be exploited in bioprocesses.

**Keywords:** *Nasua nasua*, coffee fermentation, feces of *coati*, yeasts, lactic acid bacteria.

## I. INTRODUCCIÓN

El coatí de cola anillada (*Nasua nasua*) es un mamífero que pertenece a la orden carnívora, se encuentra ampliamente distribuido en la selva del continente americano, en el Perú habita en la selva baja y ceja de selva hasta los 2500 msnm. Por su tipo de alimentación se clasifican como omnívoros, su dieta está constituida por hojas, frutos, insectos y animales pequeños. En cautiverio es alimentado principalmente a base de frutos, siendo frecuentemente encontrado en sembríos de café cuyos cerezos sirven de alimento los cuales (semillas) luego de su digestión son colectados para producir un café especial denominado “café misha”, de un alto valor sensorial y apreciado por productores y consumidores, este café es el resultado del proceso digestivo en el cual participan numerosos microorganismos <sup>(1)</sup>.

Diversos grupos de microorganismos forman parte de la fermentación espontánea del café, transformando principalmente los carbohidratos a compuestos volátiles y ácidos orgánicos, siendo las bacterias ácido-lácticas y levaduras los grupos más representativos, los cuales juegan un rol importante en este proceso. En la actualidad existen pocos estudios sobre el potencial biotecnológico de microorganismos aislados a partir de las heces de animales de sangre caliente. En base a ello se realiza la presente investigación con la finalidad de estudiar el potencial biotecnológico de las levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) encontradas en las heces del coatí de cola anillada para su aplicación en procesos fermentativos <sup>(2)</sup>.

## **II. OBJETIVOS**

### **I. Objetivo general**

Evaluar el potencial fermentativo de microorganismos aislados a partir de heces de coatí de cola anillada (*Nasua nasua*) para su aplicación en procesos tecnológicos.

### **II. Objetivos específicos**

1. Aislar e identificar bacterias ácido lácticas y levaduras a partir de heces de coatí de cola anillada (*Nasua nasua*) para su evaluación fermentativa.
2. Evaluar la cinética de crecimiento de los microorganismos aislados de heces de coatí de cola anillada (*Nasua nasua*).
3. Evaluar el comportamiento fermentativo de microorganismos aislados de heces de coatí de cola anillada (*Nasua nasua*).
4. Evaluar la producción de compuestos volátiles de importancia sensorial en cultivos puros y mixtos de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas de heces de coatí de cola anillada (*Nasua nasua*).

### **III. MARCO TEÓRICO**

### 3.1. Generalidades sobre el coatí de cola anillada (*Nasua nasua*)

El achuni, mishasho o coatí de cola anillada (*Nasua nasua*) (Figura 1), es un mamífero que pertenece a la orden carnívora, este mamífero presenta pelaje de color marrón negruzco, cola larga, peluda con anillos negruzcos y amarillentos siendo este un rasgo distintivo de este animal. Presenta hábitos diurnos, terrestres y arborícolas, es omnívoro y, se alimenta principalmente de frutos, ocasionalmente de invertebrados, vertebrados pequeños y huevos de aves <sup>(3)</sup>.



Figura 1: Coatíes de cola anillada (*Nasua nasua*)  
alimentados con cerezos maduros de café  
(Fuente propia).

#### 3.1.1. Clasificación taxonómica del coatí de cola anillada.

En la Tabla 1 se muestra información sobre la clasificación taxonómica del coatí de cola anillada según Emmons (1997) <sup>(4)</sup>.

Tabla 1: Clasificación taxonómica del coatí de cola anillada

<i>Reino</i>	<i>Animalia</i>
<i>Phylum</i>	Chordata
<i>Clase</i>	Mammalia
<i>Orden</i>	Carnívora
<i>Familia</i>	Procyonidae
<i>Sub familia</i>	Procyoninae
<i>Género</i>	<i>Nasua</i>
<i>Especie</i>	<i>Nasua nasua</i>

La especie *Nasua nasua* agrupa más de 13 subespecies, de las cuales se reconocen dos principales, el coatí sudamericano de cola amarilla y el coatí de américa central de nariz blanca. El coatí sudamericano, se distribuye desde el sur de Colombia y Venezuela hasta el norte de Argentina y Uruguay <sup>(5)</sup>.

### 3.1.2. Hábitat

En el Perú, el coatí de cola anillada habita los bosques tropicales de la selva central (Junín) y sur oriental (Puno) pudiendo encontrarlo en toda la selva central y ceja de selva hasta los 2500 msnm llegando a ocupar hasta tres ecorregiones <sup>(5)</sup>. Esta especie ocupa preferentemente lugares boscosos, aunque también se ha reportado en bosques pluviales (de hoja perenne), encontrándose en una amplia variedad de hábitats, desde bosques tropicales hasta bosques rocosos <sup>(6)</sup>.

### 3.1.3. Alimentación

El coatí de cola anillada es omnívoro, su dieta se compone de pequeños vertebrados, invertebrados y frutas. En zonas con mayor contacto con humanos



suele ingerir desechos domésticos próximos a su hábitat. Este animal tiene la habilidad de adaptarse a diferentes tipos de ambientes pudiendo variar su dieta según el tipo de alimento que encuentre disponible <sup>(7)</sup>. En la Tabla 2 se muestra la dieta común del coatí de cola anillada.

Tabla 2: Dieta común del coatí de cola anillada.

<b>Alimentos</b>	<b>% de ocurrencia</b>
Mamíferos	9.5
Aves	5
Reptiles	2.1
Anfibios	3.3
Insectos	34.9
Plantas	19.9
Comida domestica (Frutas, huesos cocidos)	14.1
Basura	7.1
Otros	4.1

Fuente: Ferreira et al. 2006 <sup>(8)</sup>.

#### 3.1.4. Sanidad

El coatí desarrolla enfermedades que son comunes en prociénidos como, distemper canino y leptospirosis, siendo además muy propensos a contraer rabia, sugiriendo su vacunación anual en condiciones de cautiverio <sup>(9)</sup>. Son frecuentemente afectados por enfermedades parasitarias, como proliferación de pulgas (*Ctenocephalides felis*) y garrapatas (*Amblyomma coelebs*). En cautiverio son susceptibles a contraer parásitos como: *ascaridos*, *ancylostomas*, cestodos y *Taenia solium* <sup>(10)</sup>.

Estudios en el Bioma Pantanal del Brasil señalan que el coatí sudamericano cumple un rol importante en el ciclo de transmisión y perpetuación de *Trypanosoma cruzi* y sus diversas variedades en la vida salvaje de este ecosistema <sup>(11)</sup>.

Al monitorear la salud de coatíes sudamericanos en el Santuario Binacional de Itapú al sur Brasil se encontraron *Mycoplasma haemofelis* y *Mycoplasma spp*, lo cual presenta un riesgo potencial de transmisión a humanos, animales domésticos y otros animales salvajes <sup>(12)</sup>.

Los coatíes son animales que viven en manadas y se diferencian por jerarquías. Asimismo, se caracterizan por ser sociables en su etapa temprana de vida, siendo esta propicia para ser criados, al madurar sexualmente empieza a presentar rasgos agresivos, que aumenta conforme alcanza su etapa adulta, siendo un peligro en para las personas que tienen contacto directo durante su crianza. En los últimos años la interacción de estos animales con humanos ha aumentado, llegando a presentar un comportamiento hostil cuando son criados en cautiverio <sup>(13)</sup>.

### 3.1.5. Importancia

En Latinoamérica los coatíes tienen poco o ningún impacto económico, sin embargo, existe una creciente demanda en algunas granjas de Junín y Pasco (Perú), las cuales, buscan criarlos en cautiverio para emplearlos en la producción de granos de café de calidad especial. El café producido presenta aromas especiales de alto valor económico en el mercado internacional. Esto ha conducido a que se desarrollen planes de negocio a gran escala que permitan comercializar este tipo de café <sup>(14)</sup>.

En su hábitat, el coatí sudamericano, al alimentarse principalmente de frutas, cumple un rol importante en la dispersión de semillas; pudiendo llegar a esparcirlas a más de tres kilómetros a la redonda. El coatí en un hábitat con acceso a comida antropogénica llega a tener un elevado nivel de población, produciendo efectos ecológicos inusuales comparado con una población normal de coatíes. Esto conduce a un desequilibrio de su hábitat, afectando su diversidad <sup>(15,16)</sup>. En la

cadena alimenticia, es fuente importante de alimento para sus depredadores tales como: *Boidae*, *Felis concolor*, *Leopardus pardalis* y *Phantera onca* <sup>(3)</sup>.

## 3.2. CAFÉ

### 3.2.1. Generalidades sobre el café

La planta de café es un árbol perenne con un solo tronco principal, ramas horizontales, racimos de flores, frutas tipo cereza y raíces de tipo axilares, laterales y pelos radicales. Tiene hojas de forma elíptica color verde oscuro que crecen en pares opuestos en el tallo principal y ramas <sup>(17)</sup>. Con respecto al proceso de maduración de los frutos o cerezos este proceso se muestra en la Figura 2 y considera una escala basada en los días después de la floración (DAF). Se puede diferenciar cuatro etapas, entre ellas: floración, fase perisperma, desarrollo del endospermo y maduración del pericarpio. En la variedad arabica este proceso toma entre 7-9 meses, mientras que variedad robusta toma entre 9-11 meses.

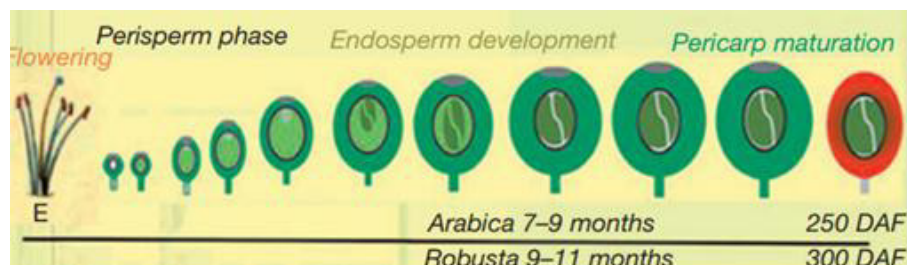


Figura 2: Proceso de desarrollo y maduración de cerezos de café.

Fuente: Oestreich (2013) <sup>(18)</sup>.

El cultivo de café se extiende entre los trópicos de cáncer y capricornio; ubicación geográfica que le brinda climas apropiados para su cultivo. La altitud, nubosidad, precipitación, radiación solar entre otras condiciones son determinantes para su producción y variedad <sup>(18)</sup>.

En el Perú destaca el cultivo de las variedades arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora*) siendo las de mayor importancia económica, representando el

65% y el 35% de la producción nacional respectivamente. Estas variedades crecen entre los 1000 a 2000 msnm (arábica) y 1500 a 3000 msnm (robusta) <sup>(19)</sup>. Los volúmenes de exportación en el año 2017 por ejemplo alcanzaron los 240 millones de kilogramos siendo los principales mercados Norteamérica, Europa y Japón <sup>(20)</sup>.

### 3.2.2. Composición química del café

El café presenta diferentes compuestos químicos tales como: nitrogenados, carbohidratos, ácidos clorogénicos entre otros (Tabla 3). Entre los compuestos nitrogenados se encuentra la cafeína (1, 3,7-trimetil-xantina) como compuesto mayoritario, así como también péptidos, aminoácidos libres y proteínas <sup>(21)</sup>.

El café al ser un fruto presenta gran cantidad azúcares los cuales se generan durante la fotosíntesis de la planta, entre los principales se tienen: glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa, siendo este último el azúcar de mayor proporción. El café también presenta diferentes lípidos tales como triglicéridos, fosfolípidos, esteroides y tocoferoles <sup>(22)</sup>.

Tabla 3: Composición química del café arábica y robusta tostado.

<b>Compuesto químico</b>	<b>Arábica tostado (% peso seco)</b>	<b>Robusta tostado (% peso seco)</b>
Cafeína	1.3	2.4
Trigonelina	0.3	0.3
Carbohidratos	38	42
Ácido clorogénico	2.5	3.8
Aminoácidos	7.5	7.5
Ácidos orgánicos	2.4	2.6
Melanoidinas	25.4	25.9
Aromas volátiles	0.1	0.1
Minerales	4.5	4.5

Fuente :Geromel (2006)<sup>(22)</sup>

Otro grupo de componentes químicos encontrados comúnmente en las semillas de café son los ácidos clorogénicos, los cuales son compuestos polifenólicos y son un indicador de calidad ya que al disminuir su concentración en el grano incrementa la calidad de la bebida, esto se logra durante el proceso de tostado <sup>(23)</sup>.

### 3.2.3. Compuestos volátiles en el café

En el fruto de café despulpado se ha logrado identificar hasta 200 compuestos volátiles, mientras que en los granos de café tostado se identificaron hasta 1000 componentes, de los cuales, 20 son los más representativos y se emplea como indicador de calidad y aroma (Tabla 4). De estos el 2-furfuriltiol (FFT) presenta un olor sulfuroso y determina el aroma característico del café, este se forma por las reacciones entre cisteína y arabinosa el cual se libera de los polisacáridos del café <sup>(24)</sup>. Entre los componentes relacionados a la calidad sensorial del café, se agrupan dependiendo del tipo de aroma que imparten, el aroma a dulce acaramelado es generado por 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (furaneol), 2,3-butano-diona (diacetilo), 2,3-pentano-dione, 2-metilbutanal, 2-etil-4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona, metilpropanal, 3-metilbutanal (vainillina). Los compuestos que imparten aromas a tierra incluyen el 2-etil-3,5-dimetilpirazina, 2,3-dietil-5-metilpirazina, 2-ethenil-3-etil-5-metilpyrazine, 3-isobutil-2-metoxipirazine y 2-ethenil-3,5-dimetilpirazine. El aroma a sulfurado y tostado está relacionado con el metanetodiol, 2-furfuriltiol, methional, 3-mercapto-3-metil-butil formato, 2-metil-3-furan-tiol, 3-metil-2-buten-1-tiol y dimetil trisulfuro. Los aromas a ahumado están relacionados a 4-vinilguaiacol, guaiacol, 4-etilguaiacol. Notas especiales como aromas frutales están relacionados con el acetaldehído, propanal, b-damascenone y, los aromas picantes a 3-hidroxi-4,5-dimetil-2-furanone (sotolone), 4-etil-3-hidroxi-5-metil-2(5H)-furanone <sup>(24)</sup>.

Tabla 4: Relación de los principales componentes y los aromas identificados en el café

Compuestos químicos	Concentración (ppb)	Descriptor sensorial
Ácidos orgánicos	18,060–32,180	Dulce y ácido
Furanona	112-140000	Caramelico, picante
Cetonas	34000-49000	Mantecosa acaramelado
Norisoprenoides	222-260	Fruta y miel
Componentes fenólicos	1420-55200	Fenólico, quemado, picante y vainilla
Pirazinas	2.4-400	Terroso tostado
Componentes sulfurados	213-500	Patata hervida y carne.
Tioles	77-1700	Carne, tostado café y carne.

Fuente: Oestreich (2013) <sup>(18)</sup>

#### 3.2.4. Microorganismos comunes presentes durante la fermentación de café

Durante el proceso de fermentación del café están presentes una importante comunidad de microorganismos (Tabla 5), encontrándose comúnmente *Enterobacterias*, *Erwinia dissolvens*, *Escherichia coli* y *Klepsiella neumonieae*. La fermentación también es acompañada por un importante número de bacterias ácido lácticas tales como: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus plantanarum* y *Enterococcus casseiliflavus* <sup>(25)</sup>. Asimismo, bacterias tales como *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* también son encontrados durante la fermentación. Las levaduras también forman parte de la microflora comprendida en la fermentación, siendo *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*, los géneros más representativos y comúnmente aislados <sup>(26)</sup>.

Tabla 5: Microflora presente durante la fermentación de café.

<b>Especies identificadas</b>	<b>Especie seleccionada</b>	<b>Fuente</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pichia anomala</i> , <i>P.caribbica</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Saccharomyces sp.</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>C. membranifaciens</i> , <i>Kloeckera sp.</i> , entre otros.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Silva et al.2012 <sup>(25)</sup>
<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>D. polymorphus</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>P. Burtonii</i> , <i>Candida fermentati</i> , <i>C. saitoana</i> , <i>C. membranifaciens</i> entre otros.	<i>Pichia guilliermondii</i>	Evangelista et al. 2014 <sup>(26)</sup>

### 3.3. MICROFLORA AISLADA A PARTIR DE HECES DE ANIMALES

La microbiota intestinal de los mamíferos está asociada de manera simbiótica, es diversa y se encuentra estrechamente relacionada a los hábitos de alimentación y salud del individuo <sup>(27)</sup>. La flora microbiana presente está compuesta por lo general por aproximadamente de  $10^{10}$ - $10^{14}$  células/cm<sup>2</sup>, e incluyen microorganismos del reino: fungi, bacteria, archaea, protozoa, virus, y bacteriófagos. La concentración y la composición de la microflora varía dependiendo de la ubicación en el tracto digestivo <sup>(28)</sup>. Por ejemplo, al estudiar la microbiota de las heces de ratas de laboratorio en diferentes puntos del tracto intestinal es común encontrar una gran diversidad de levaduras, siendo frecuentemente aislados *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens* e *Issatchenkia orientalis* (y su amorfo *Candida krusei*), y otros

grupos con menor frecuencia, entre ellos patógenos oportunistas tales como: *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis* <sup>(29)</sup>.

Por otro lado, al estudiar la diversidad de lactobacilos y bifidobacterias presentes en muestras de heces de 26 animales (16 especies), se ha detectado predominante *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc pseudomesenteroides* principalmente en especies omnívoras. Estos microorganismos están usualmente presentes en materias primas vegetales que sirven como alimento <sup>(30)</sup>.

### 3.3.1 Identificación genética de microorganismos

En los estudios de filogenia y taxonomía de microorganismos se utiliza el ARN ribosómico 16S y 26S. Los ácidos nucleicos, proteínas, nucleótidos y aminoácidos son comunes en todos los seres vivos, lo cual permite encontrar relaciones filogenéticas entre los seres vivos y permite segregarlos mediante un árbol genealógico por medio de taxones agrupados, los que a su vez se agrupan en rangos más altos. Los taxones relacionados presentan características comunes entre sí, pero a su vez presentan características que los diferencian de los demás. El estudio del ARN, el cual tiene regiones de gran variabilidad, permite diferenciar y clasificar a los seres vivos según su distancia evolutiva, llegando a clasificarlos en: dominio, reino, filo, clase, orden, familia, género, especie hasta cepa, estudiando las regiones de gran variabilidad, esto permite obtener patrones únicos para cada individuo. Por ello, para el estudio de regiones de gran variabilidad se utiliza el ARN ribosómico, 16S en bacterias y 26S en levaduras, el cual es diferente para cada individuo y permite su identificación <sup>(33)</sup>.



### 3.4. FERMENTACIÓN MICROBIANA

La fermentación es un proceso bioquímico donde los microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos convierten un sustrato (azúcar fermentable) en uno o más sub productos (ácido láctico, biomasa, etanol, etc.), como resultado la célula obtiene energía que es utilizado en sus actividades metabólicas. Se conocen tres tipos principales de fermentación, la fermentación natural en donde interaccionan tanto microorganismos deseados como indeseados <sup>(34)</sup>. La fermentación llamada “Back slopping” el cual consiste en utilizar los microorganismos de una fermentación natural como inóculo para una nueva fermentación y controlar algún parámetro específico con la finalidad de favorecer la actividad de algún microorganismo de interés. Sin embargo, el inconveniente es que se producen compuestos heterogéneos debido a la variación de la actividad de los microorganismos que participan en la fermentación. Adicionalmente presenta altas posibilidades de falla aumentando el riesgo de transmitir enfermedades <sup>(35)</sup>. Finalmente, la fermentación controlada se caracteriza por utilizar altas tasas de inóculo (más de  $10^6$  células/ml) y se llevan a cabo ya sea como cultivo puros o mixtos. Las condiciones de incubación están determinadas por el crecimiento de las células <sup>(34,35)</sup>.

#### 3.4.1. Fermentación de alimentos

Las comidas y bebidas fermentadas forman parte de la dieta del ser humano, y para ello se emplean microorganismos benéficos. Estos alimentos se han producido y consumido desde el inicio de las civilizaciones. Por ejemplo, en las áreas tropicales de Mesopotamia se guardaba el alimento excedente, el cual podía sufrir un proceso de fermentación. Con el avance de la microbiología, bioquímica e ingeniería, los procesos fermentativos fueron mejorando y tuvieron repercusión en el auge de las industrias de fermentación <sup>(36)</sup>.

### 3.4.2. Fermentación ácido láctica

Las bacterias ácido lácticas tienen un rol esencial en la preservación de alimentos e influyen en la calidad sensorial, brindando sabores adecuados. La fermentación ácido láctica es generalmente de bajo costo, las bacterias ácido lácticas fermentan los azúcares para formar principalmente ácido láctico y otros compuestos, ya sea por vía homo o heterofermentativa <sup>(37)</sup>.

#### A. Vía homofermentativa

Se lleva a cabo mediante la vía Embden-Meyerhof-Parnas resultando en la transformación de glucosa a piruvato (Figura 3) y finalmente produciendo ácido láctico. Estequiométricamente, a partir de 1 mol de glucosa se produce normalmente dos moles de ácido láctico. En la actualidad el rendimiento más cercano es 1.8 moles. Energéticamente se llega a producir dos moles de ATP por mol de glucosa <sup>(38)</sup>.

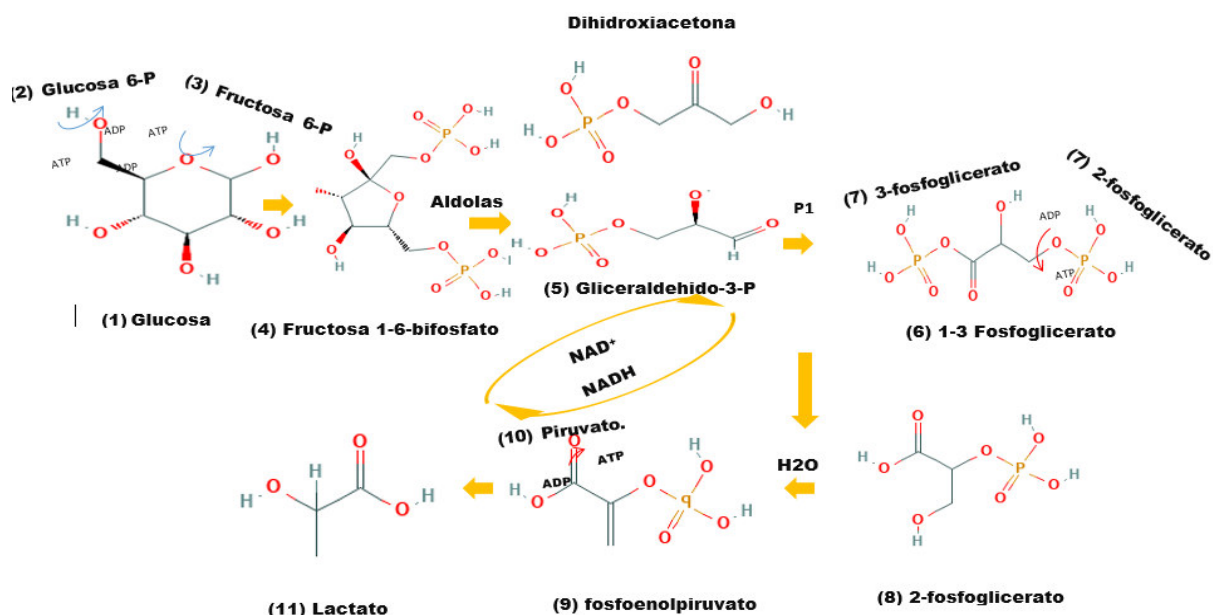


Figura 3: Ruta metabólica de producción de ácido láctico por bacterias ácido lácticas homofermentativas<sup>(39)</sup>

## B. Vía heterofermentativa

En esta vía, a partir de 1 mol de glucosa, bacterias heterofermentativas producen 1 mol de lactato, CO<sub>2</sub>, ácido acético o etanol. Los microorganismos heterofermentativos no poseen aldolasa, en lugar de ellos poseen una fosfoketolasa, enzima encargada de romper xilulosa -5-fosfato para formar gliceraldehído-3-fosfato y acetil fosfato <sup>(40)</sup>.

### 3.4.3. Fermentación por levaduras no-*Saccharomyces*

En procesos fermentativos espontáneos donde predominan levaduras no-*Saccharomyces* estas son inhibidas a medida que incrementa la concentración de etanol en el medio (4-5% v/v). Las levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* comparten rutas metabólicas comunes, ambos grupos metabolizan glucosa a través de la glucólisis <sup>(41)</sup>. Esta vía opera tanto a condiciones aerobias y anaerobias y metaboliza la glucosa a piruvato. Luego, el piruvato es transformado en acetaldehído y este a etanol y como resultado se genera 2 moles de ATP. A condiciones aerobias se producen 36 moles de ATP mediante el proceso de oxidación completa <sup>(42)</sup>. Como resultado del metabolismo de levaduras se producen componentes de alto valor sensorial tales como: alcoholes superiores, aldehídos, ácidos grasos y ésteres en diferentes proporciones dependiendo de la cepa y los parámetros empleados para su producción. Estos compuestos juegan un rol importante en la definición de la calidad sensorial de alimentos y bebidas fermentadas <sup>(42,43)</sup>.

## **IV. METODOLOGÍA**

#### **4.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA**

Para el aislamiento de microorganismos se recolectaron muestras de heces de coatíes de cola anillada (*Nasua nasua*) provenientes del criadero de la hacienda cafetalera High Land Coffe (La Merced, Junín). Para ello, los coatíes se alimentaron con sus raciones habituales, en dos etapas; en la mañana su alimentación consistió básicamente de frutos producidos en la región, tales como: papaya, naranja y huevos de gallina, en la tarde se los alimentó con cerezos maduros de café.

Se recolectaron asépticamente tres muestras de heces frescas procedentes de tres diferentes coatíes. Las muestras fueron almacenados en tres diferentes envases; una primera muestra de aproximadamente de 2.0 g, se colocó en un frasco termoshock de 1L conteniendo 600 ml de una solución de agua peptonada (Himedia, India) al 0.5% p/v, luego, la segunda muestra (aprox. 300 mg) conteniendo granos de café digerido se colocó en un envase estéril de plástico conteniendo 150 ml de agua peptonada (0.5% p/v) y finalmente, la tercera muestra de heces (aprox. 300 mg) se colocó en un envase de plástico estéril sin agua peptonada. Todas las muestras, para su transporte fueron refrigeradas en un baño de hielo hasta su uso en los ensayos de aislamiento. Una vez en el laboratorio, las muestras sin peptona se diluyeron en 100 mL de una solución de agua peptonada (0.5% p/v) <sup>(44)</sup>.

#### **4.2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS**

El aislamiento de microorganismos se llevó a cabo usando medios de cultivo sólidos y líquidos selectivos siguiendo los protocolos microbiológicos establecidos. El aislamiento se realizó en el “Laboratorio de Bioprocesos y Tecnología de Fermentación” de la Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM. Todos los procedimientos se realizaron a condiciones asépticas utilizando una cabina de bioseguridad clase 2A1 (Pachane-Brazil).

#### 4.2.1. Aislamiento de levaduras

El aislamiento de levaduras se realizó en placas Petri conteniendo agar selectivo OGYE (Himedia, India) más 100 mg/L de oxitetraciclina. A partir de cada muestra se tomó 1 mL y se realizaron diluciones sucesivas en tubos de ensayo utilizando agua peptonada (0.5% p/v) estéril; luego a partir de cada dilución se sembraron en agar OGYE e incubaron a 30 °C hasta visualizar el crecimiento de colonias separadas (72 h). A partir de las últimas diluciones ( $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ ) se aislaron aleatoriamente cinco colonias definidas y se inocularon en tubos de ensayo conteniendo agar inclinado OGYE (más 100 mg/L de oxitetraciclina) y se incubaron a 30 °C por 48 h <sup>(45)</sup>.

#### 4.2.2. Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL)

El aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) se llevaron a cabo utilizando agar MRS, (Himedia, India) con 20 mg/L de vancomicina y, agar MRS enriquecido con 5.0 g/L de extracto de levadura, 5.0 g/L de peptona y 20.0 mg/L de vancomicina. A partir de 1.0 mL de muestra se realizaron diluciones sucesivas con agua peptonada (0.5% p/v) y luego, a partir de cada dilución se sembraron en medios antes mencionados, se incubaron a 30 °C hasta visualizar colonias separadas y definidas (48 h). A partir de las últimas diluciones ( $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) se aislaron aleatoriamente cinco colonias definidas y se inocularon en tubos de ensayo conteniendo agar inclinado agar MRS con vancomicina (20 mg/L) y se incubaron a 30 °C por 48 h <sup>(46)</sup>.

### 4.3. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

#### 4.3.1. Identificación preliminar

## A. Evaluación morfológica

Las cinco colonias aisladas de cada grupo microbiano (levaduras y bacterias ácido lácticas) se evaluaron morfológicamente por microscopia óptica. En el caso de levaduras se analizaron la morfología celular (ovalada, elipsoidal, alimonada, etc.) y en el caso de BAL (forma bacilar y cocae). Con la finalidad de mejorar la visualización morfológica de levaduras se empleó cristal violeta y la identificación preliminar se basó en el manual de Spencer <sup>(47)</sup>.

## B. Tinción Gram

Los microorganismos previamente pre-identificados como bacterias ácido lácticas fueron evaluados mediante tinción Gram. Para ello se emplearon cultivos frescos bacterianos. Los microorganismos que presentan una capa gruesa de peptidoglucano en su pared celular son capaces de retener el cristal violeta y se identifican como Gram positivos <sup>(48)</sup>. Con la finalidad de facilitar la pre-identificación se tomó como referencia el manual de bacteriología sistemática de Bergeys <sup>(49)</sup>.

## 4.4. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

### 4.4.1. Test Catalasa

La actividad catalasa nos permite conocer si un microorganismo es tolerante al oxígeno. Los microorganismos aerobios o anaerobios facultativos utilizan esta enzima para romper el peróxido de oxígeno ( $H_2O_2$ ) producido durante el metabolismo oxidativo de la fuente de carbono, teniendo como aceptor final de electrones el oxígeno. Las bacterias que resultaron Gram positivas en la Sección 4.3.1B se sometieron a la reacción de catalasa. Para el análisis se tomó una asada de un cultivo con una edad no mayor de 48 horas y se colocó en un portaobjeto, luego se

agregó peróxido de hidrógeno (3% v/v) y se esperó 3 minutos para observar la reacción. El test resulta positivo cuando se observa la formación de burbujas. Las levaduras se caracterizan por desarrollar un metabolismo oxidativo en presencia de oxígeno. Así, su supervivencia durante el metabolismo aerobio depende de la síntesis de catalasa. Utilizan el oxígeno del aire como aceptor final de electrones y oxidan totalmente la glucosa, lo que les reditúa la mayor cantidad de energía en forma de ATP. <sup>(50)</sup>.

#### 4.4.2. Asimilación de compuestos químicos

Con la finalidad de realizar una identificación bioquímica más completa se utilizaron Kits API específicos para cada grupo microbiano (ID 32C para levaduras y 50CHL bacterias ácido lácticas). Las pruebas bioquímicas con kits API se basan en reacciones de aglutinación o cambio de color por un determinado indicador, el principio de codificación empleado se fundamenta en recopilar información binaria positivo/negativo (+/-) relacionado al consumo de algún azúcar presente en los pocillos del kit, entre ellos: D-galactosa, cicloheximida, D-sacarosa, N-acetil glucosamina, ácido láctico, L-arabinosa, D- celobiosa, D-rafinosa, D-maltosa, D-threalosa, 2-ketoglucanato de potasio, metil-alfa-glucopiranosida, D-manitol, D-lactosa, Inositol, D-sorbitol, D-xilosa, D-ribosa, glicerol, L-ramnosa, palatinosa, eritritol, D-melibiosa, glucoronato de sodio, D-melezitose, gluconato de potasio, ácido levulinico, D-glucosa, L-sorbosa, glucosamina, citrato férrico de esculina, eritritol, D-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, L-xilosa, D-anoditol, metil-beta-D-xilopiranosida, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-sorbosa, dulcitol, metil-alfa-D-glucopiramidosa, amigdalina, arbutina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa, D-melobiosa, D-trealosa, inulina, D-melisitosa, D-rafinosa, almidón, glicógeno, xilitol, gentiobiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato de potasio, 2-ketogluconato de potasio, 5-ketogluconato de potasio, L-arginina, L-lisina, L-ornitina, trisodio citrato, tiosulfato de sodio, urea, L-triptofano, piruvato de sodio, gelatina, D-milibiosa y amigdalina. Se señala como positivo si existe algún



cambio que evidencie su utilización. Para realizar las pruebas bioquímicas se empleó microorganismos puros de menos de 48 horas de edad <sup>(51 y 52)</sup>.

#### A. Pruebas bioquímicas para levaduras

Se evaluaron las cinco colonias de levadura aisladas. Para la identificación bioquímica se empleó el kit API ID 32C el cual es un test de asimilación, cuenta con 32 fuentes distintas de carbono, la evidencia del consumo se refleja en la formación de aglutinación, lo cual indica que el microorganismo es capaz de asimilar la fuente de carbono encontrada en el pocillo, dando una reacción positiva. Además, presenta un pocillo adicional con esculina, para una reacción auxiliar en caso que el sistema presente una baja discriminación entre dos especies y se utiliza para diferenciarla entre ambas. Para los ensayos, las muestras celulares se diluyeron en 3 mL de agua destilada estéril hasta alcanzar una concentración de 2 Macfarlán, luego se tomó 250 µL y se agregó al medio API ID 32C. Seguidamente se homogenizó y agregó 135 µL a cada pocillo del API ID 32C, se taparon y llevaron a incubar a 30 °C, luego de 24 y 48 horas se evaluaron reacciones de aglutinación. Con la finalidad de interpretar los resultados se compararon las dos mediciones realizadas y la identificación se realizó usando el API web software <sup>(51)</sup>.

#### B. Pruebas bioquímicas para bacterias ácido lácticas

Se evaluaron las cinco colonias de bacteria lácticas aisladas. Para la identificación bioquímica se empleó el Kit API CHL 50 el cual permite identificar representantes del género *Lactobacillus* y relacionados. Se basa en la capacidad del microorganismo de fermentar 49 carbohidratos y un blanco. Durante el test el microorganismo fermenta los carbohidratos produciendo ácido, lo cual disminuye el pH haciendo que el indicador púrpura de bromocresol vire de amarillo a púrpura. Los resultados son procesados por el software API web permitiendo la identificación del microorganismo.

Para el análisis bioquímico se tomó un cultivo de una edad menor a 48 horas y se diluyó en agua destilada estéril hasta alcanzar una concentración de 2 Macfarlán. Luego se adicionó al medio API 50 CH considerando alcanzar una concentración recomendada por el proveedor. Luego, el medio se homogenizó y se agregó 135 µL a cada pocillo del API 50CH. Los 50 pocillos se cubrieron con parafina para generar condiciones anaerobias y se incubaron a 30 °C por 48 horas y se evaluaron cada 24 horas. Finalmente, los resultados obtenidos se analizan a través del software API web <sup>(52)</sup>.

## **4.5.IDENTIFICACIÓN MOLECULAR**

### **4.5.1. Preparación de muestras**

Las levaduras y bacterias ácido lácticas previamente identificadas bioquímicamente se sometieron a verificación y confirmación. Para la identificación molecular se prepararon cultivos frescos de levaduras y BAL en agar OGYE y MRS respectivamente. Las placas Petri se cerraron herméticamente con parafina y se colocaron en un recipiente refrigerado (7°C) para asegurar su mantenimiento. La identificación molecular fue realizada por la empresa Macrogen (Corea del Sur) <sup>(53)</sup>.

### **4.5.2. Identificación mediante 16S y 26S ARNr.**

La identificación molecular de los microorganismos se llevó a cabo mediante secuenciamiento 16S y 26S ARNr, los cuales permiten establecer las relaciones filogenéticas existentes en los organismos procariotas y eucariotas. El método de identificación se fundamenta en la obtención, secuenciamiento y alineamiento de productos de PCR de los genes correspondientes para luego comparar con bases de datos de ARN. Para la extracción se emplea Miniprep/Midiprep kit ADN luego se

amplifica en un termociclador; se emplea oligonucleótidos iniciadores LR0R 5'-3', LR7 5'-3' y 785F 5'-3, 907R 5'-3' para levaduras y bacterias respectivamente. Luego se realiza la secuenciación del amplicon, en esta etapa se llevan a cabo las reacciones de secuenciación y el análisis de los productos por electroforesis, una vez obtenido estos se realiza un análisis de secuenciación, en esta etapa se realizará la comparación de la secuencia del ADNr 16S y ADNr 26S con las depositadas en bases de datos (GenBank NCBI) construyendo árboles genealógicos a partir de su comparación <sup>(54)</sup>.

#### **4.6.EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO**

A partir de los microorganismos identificados molecularmente se utilizaron en lo sucesivo tres cepas de levaduras y tres de bacterias ácido lácticas. Los microorganismos se cultivaron en matraces de 250 mL conteniendo 150 mL de medio sintético con la finalidad de evaluar la cinética de crecimiento. En cada matraz se inocularon dos asadas del respectivo microorganismo. El medio de cultivo para BAL estuvo compuesto por caldo MRS (55.0 g/L), extracto de levadura (5.0 g/L) y peptona (5.0 g/L), mientras que para el cultivo de levaduras se empleó un medio compuesto por 30.0 g/L de glucosa, 1.0 g/L de extracto de levadura y 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El pH de los medios se ajustó a 5.5 con HCl (5% v/v). Ambos grupos microbianos se cultivaron a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Las BAL se cultivaron a condiciones estáticas, mientras que las levaduras en agitación a 100 rpm <sup>(55)</sup>. Se tomaron 2.0 mL de muestra cada tres horas, se centrifugaron (4000 rpm por 5 minutos) y eliminaron el sobrenadante, luego se procedió a lavar dos veces con agua destilada y finalmente se re-suspendió con agua destilada hasta el volumen original. La cinética de crecimiento se evaluó por densidad óptica a 600 nm. Para ello, las muestras antes de la medición se diluyeron con agua destilada, hasta alcanzar un valor menor o igual 0.4. A partir de las curvas

obtenidas se determinó la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) y se comparó entre las cepas ensayadas <sup>(56)</sup>.

#### **4.7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA DE MICROORGANISMOS**

Se evaluaron la actividad fermentativa de los microorganismos mencionados tanto como cultivos puros y mixtos.

##### **4.7.1. Preparación de inóculo**

Los inóculos se propagaron a 30 °C en matraces de 100 mL conteniendo 50 mL del medio respectivo y ajustado a pH 5.5 con HCl (5% v/v). En el caso de levaduras el medio consistió de 30.0 g/L de glucosa, 5.0 g/L de extracto malta, 1.0 g/L de extracto de levadura y 1.0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y, para el caso de BAL el medio estuvo compuesto de: 55.0 g/L de MRS, 5.0 g/L de peptona y 5.0 g/L de extracto de levadura. La propagación se realizó durante 48 horas; en el caso de levaduras se llevó a cabo en agitación (150 rpm) y en el caso de BAL a condiciones estáticas. El volumen de inóculo fue de 10 %v/v para ambos tipos de cultivo. En el caso de cultivos mixtos la relación de cada cepa fue de 1:1. El volumen de inóculo respectivo fue centrifugado (4000 rpm por 5 minutos) y el pellet resultante fue inoculado al matraz correspondiente <sup>(57)</sup>.

##### **4.7.2. Fermentaciones con cultivos puros**

Las fermentaciones con cultivos puros se realizaron a 30 °C en matraces de 250 mL conteniendo 150 mL de medio ajustado a pH 5.5 con HCl (5% v/v). El medio para las fermentaciones con levaduras estuvo compuesto de glucosa (30.0 g/L), extracto malta (5.0 g/L), extracto de levadura (1.0 g/L) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.0 g/L), mientras que el medio para BAL estuvo compuesto de: MRS (55.0 g/L), extracto de levadura (5.0

g/L), peptona (5.0 g/L). Todas las fermentaciones se realizaron a condiciones estáticas con agitación periódica (1 minuto) cada 24 horas. Las muestras (10 mL cada una) se tomaron cada 12 horas y se utilizaron para determinar el consumo de azúcar, variación de pH, producción de ácido láctico y compuestos volátiles de importancia sensorial. Las fermentaciones se consideraron terminadas cuando dos lecturas de pH fueron iguales <sup>(58)</sup>.

#### 4.7.3. Fermentaciones con cultivos mixtos

Las fermentaciones con cultivos mixtos se realizaron en matraces de 250 mL conteniendo 150 mL de medio de cultivo. Los cultivos mixtos se realizaron de la siguiente manera: una levadura y una bacteria ácido láctica, las tres levaduras juntas, las tres bacterias ácido lácticas juntas y finalmente las tres levaduras y tres bacterias ácido lácticas juntas. Las combinaciones realizadas se basaron en los resultados de capacidad de crecimiento. El medio de cultivo estuvo compuesto de: caldo MRS (55.0 g/L), glucosa (50.0 g/L), extracto de levadura (5.0 g/L), ZnSO<sub>4</sub> (0.5 g/L), AlSO<sub>4</sub> (0.5 g/L) y extracto de malta (10.0 g/L). El pH del medio se ajustó a 5.5 con HCl (5% v/v). Las fermentaciones se realizaron a condiciones estáticas con agitación periódica (1 minuto) cada 24 horas. Se tomaron muestras (10 mL) cada 12 horas, las cuales sirvieron para la determinación del consumo de azúcar, variación de pH, producción de ácido láctico y compuestos volátiles de importancia sensorial. Las fermentaciones se consideraron terminadas cuando dos lecturas de pH fueron iguales <sup>(59)</sup>.

## 4.8. ANÁLISIS QUÍMICO

### 4.8.1. Determinación de azúcares reductores

Los azúcares consumidos durante la fermentación se determinaron por el método del ácido dinitrosalicílico – DNS, el cual es un método colorimétrico que se fundamenta en la hidrólisis del azúcar en una solución alcalina el cual permite la reducción del grupo nitro presente en el DNS formando 3-amino-2-hidroxi-5-nitrobenzoato de sodio el cual resulta en una coloración cuya intensidad se mide a 540 nm. Para la cuantificación se construyó una curva patrón empleado glucosa como estándar en concentraciones de 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm diluido en agua destilada. Para las determinaciones se utilizaron pequeños volúmenes de muestra (300 µL), las cuales fueron diluidas con agua destilada y luego sometidas a la reacción de oxidación a temperatura de ebullición. Los resultados de las reacciones se midieron por espectrofotometría visible a 540 nm <sup>(60)</sup>.

### 4.8.2. Determinación de ácido láctico

El ácido láctico producido durante las fermentaciones se determinó por el método colorimétrico de Borshchevskaya modificado, el cual se fundamenta en la reacción entre iones férricos y los alfa-hidroxiácidos de la muestra. Para la determinación se empleó una solución de  $\text{FeCl}_3$  (0.1N) como agente oxidante y para la cuantificación se construyó una curva patrón utilizando ácido láctico como estándar a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 ppm. Los resultados de las reacciones químicas se midieron por espectrofotometría a 440 nm <sup>(61)</sup>.

#### 4.8.3. Determinación de compuestos volátiles de importancia sensorial

Los compuestos volátiles de importancia sensorial producidos durante las fermentaciones, fueron analizados por cromatografía gaseosa (GC). El análisis se realizó por triplicado; para cada análisis se empleó 1 litro de fermento, el cual fue destilado empleando un alambique, el cual consta de una olla o caldero donde se calentó el fermento elevando los vapores a un capitel para luego pasar a través de un conducto llamado "Cuello de cisne", llegando finalmente a un serpentín o condensador cubierto por un medio refrigerante (agua). Entre los compuestos analizados se tienen; alcohol isoteramilico, etil acetato, Isoamil acetato, alcoholes superiores (Iso-propanol, propanol, butanol, iso-butanol y 3-metil-1-butanol/2-metil-1-butanol) y ésteres totales, acidez volátil, adicionalmente se determinó el grado alcohólico y extracto seco. En los análisis se utilizó un cromatógrafo (Intuvo 9000GC agilent) y detector FID. Las condiciones de análisis fueron: temperatura del inyector 60°C y de la columna 220°C. La gradiente de temperatura fue la siguiente 3°C/min se inyectó con un flujo 2mL/min <sup>(62)</sup>. Los análisis se realizaron en el laboratorio Calidad total La Molina.

#### 4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y de manera aleatoria, los resultados se presentan como promedios y error estándar. El procesamiento de los resultados se realizó mediante la hoja de cálculo Excel.

## **V. RESULTADOS**



## 5.1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos provenientes de las heces del coatí de cola anillada (*Nasua nasua*) se aislaron de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección 4.2. El aislamiento se realizó utilizando medios de cultivo selectivos conteniendo antibióticos recomendados en la literatura. Entre los microorganismos aislados están levaduras y bacterias ácido lácticas.

### 5.1.1 Aislamiento de levaduras

Las levaduras son de particular interés ya que son ampliamente utilizados en muchos procesos fermentativos. Para su aislamiento se usó agar OGYE (Oxitetraciclina, glucosa, extracto de levadura). La oxitetraciclina actúa sobre la subunidad ribosomal 30S y evita que el ARNt de aminoácido se una al complejo de traducción de ARNm del ribosoma evitando la traducción y con ello evita el crecimiento celular de bacterias <sup>(63)</sup>. En la figura 4 se muestran los tubos de ensayo conteniendo colonias de levaduras aisladas en agar inclinado. Las colonias son típicamente de color crema, típico de levaduras. Las levaduras aisladas se codificaron como Lev 01, Lev 02, Lev 03, Lev 04, Lev 05 para su posterior estudio.



Figura 4: Levaduras aisladas en agar OGYE.

### 5.1.2 Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL son microorganismos de gran importancia biotecnológica e industrial, pueden ser aprovechados como cultivos probióticos, cultivos iniciadores en la fermentación de alimentos, producción de bacteriocinas y también en la producción de ácido láctico. El aislamiento se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la Sección 4.2.2. En la figura 5 se muestran los tubos de ensayo conteniendo agar inclinado MRS con vancomicina. La vancomicina actúa inhibiendo la biosíntesis de los componentes de la pared celular, previniendo la incorporación de ácido N-acetil murámico y N- acetil glucosamina <sup>(64)</sup>. Así inhibe el crecimiento de microorganismos competidores tales como *Enterobacterias* y *eubacterias*.



Figura 5: Bacterias ácido lácticas aisladas en agar MRS con vancomicina.

## 5.2 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

La identificación de los microorganismos aislados se realizaron preliminarmente mediante pruebas presuntivas basadas en la morfología celular y tinción Gram descritas en la Sección 4.3. Estas pruebas preliminares son herramientas útiles que ayudan a identificar grupos de microorganismos basados en sus características

generales. Las levaduras tienen morfología definidas fácilmente reconocidas en el microscopio óptico mientras que las bacterias se diferencian de otras por la respuesta a los reactivos usados en la tinción Gram.

#### 5.2.1 Identificación presuntiva

##### A. Análisis morfológico de levaduras

Las levaduras presentan morfología variada dependiendo del género, especie, fase de crecimiento e incluso de la composición del medio. Las levaduras aisladas presentaron forma esférica (Figura 6a) y elipsoidal (Figura 6b). La morfología elipsoidal es más común entre las levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. La evaluación morfológica se realizó durante las primeras 24 horas de cultivo, considerando la fase exponencial de crecimiento.

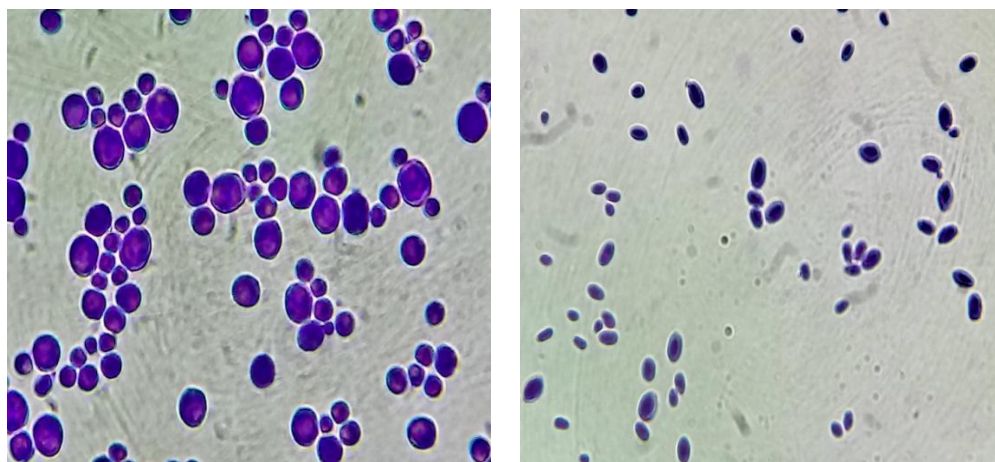


Figura 6: Morfología de levaduras evaluadas por microscopia óptica (100X) en medio compuesto por 30.0 g/L de glucosa, 1.0 g/L de extracto de levadura y 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

##### B. Tinción Gram y evaluación morfológica de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas son Gram positivas y se caracterizan por presentar morfologías definidas (bacilar o cocal). Pueden estar organizadas formando cadenas

o en forma de diplococos, etc. Las colonias aisladas resultaron en Gram positivas y presentaron morfología en forma de cocos (Figura 7a) y bacilar (Figura 7b). La evaluación se llevó a cabo en base al Manual Bergeys 1974 <sup>(49)</sup>.

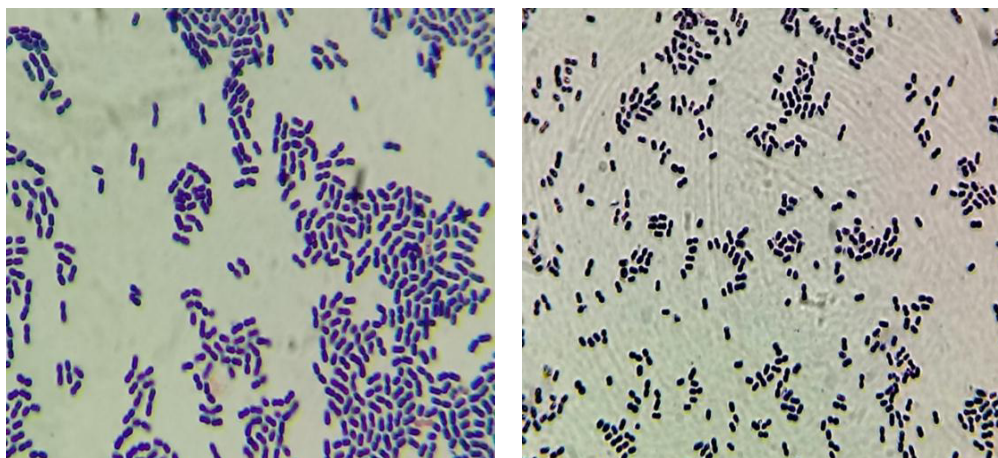


Figura 7: Morfología de BAL evaluadas por microscopia óptica (100X) en caldo MRS.

#### 5.2.2 Identificación bioquímica

La identificación bioquímica se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita en la Sección 4.4. Se evaluaron la actividad catalasa y la asimilación de diferentes compuestos químicos. En los ensayos de asimilación se utilizaron Kits API para levaduras (API ID 32C) y bacterias ácido lácticas (API 50 CHL). Los resultados se interpretaron ayudado del software API web adquirido del proveedor. La identificación bioquímica es una herramienta útil para la identificación de microorganismos siempre que estén dentro del espectro de utilización de los compuestos considerados en el Kit.

##### A. Actividad catalasa

De las levaduras ensayadas, todas ellas resultaron positivas al ensayo de la catalasa (Figura 8).



Figura 8: Evaluación de la actividad catalasa en levaduras, se muestra la formación de burbujas producto de la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y oxígeno.

Seguidamente se evaluó la actividad catalasa de las bacterias consideradas como ácido lácticas. El resultado de un representante se muestra en la Figura 9. De todas ellas ninguna presento actividad catalasa positivo lo que indicaría que el oxígeno afectaría su actividad metabólica. Las bacterias ácido lácticas se caracterizan por tolerar pequeñas concentraciones de oxígeno y esto se debe a que presentan una pseudocatalasa el cual permitiría que el peróxido de hidrógeno producido sea descompuesto por esta enzima <sup>(65)</sup>.



Figura 9: Actividad catalasa en bacterias presuntivamente ácido lácticas, mostrando la producción de burbujas producto de la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y oxígeno.

#### B. Ensayos de asimilación de compuestos químicos

La identificación bioquímica se llevó a cabo mediante ensayos de asimilación de compuestos químicos. Para ello se utilizaron Kits API para levaduras y bacterias ácido lácticas. Las reacciones de asimilación se basan en la capacidad que tiene cierto microorganismo para metabolizar un determinado compuesto y como resultado

producir algún subproducto que permita evidenciarlo mediante reacciones que resultan en un cambio de coloración, precipitación, etc.

#### B1. Identificación bioquímica de levaduras

En la identificación de levaduras se utilizó el Kit API® ID 32C el cual consta de 25 diferentes compuestos químicos. Para realizar la identificación bioquímica se utilizaron cultivos frescos de las levaduras aisladas, los cuales se inocularon a los pocillos de cada tira conteniendo los compuestos químicos respectivos. Seguidamente se incubaron y luego de 48 h se evaluaron. Los resultados se interpretaron mediante el software API Web. De las levaduras evaluadas, se identificaron principalmente *Candida famata* y *Candida krusei*. En la Tabla 6 se muestra los resultados de la identificación de levaduras.

Tabla 6: Identificación bioquímica de levaduras aisladas mediante el Kit API ID 32C.

<b>Código</b>	<b>Taxón significativo</b>	<b>Proximidad relativa al taxón indicado (%ID)</b>	<b>Proximidad al perfil más típico del Taxón (T)</b>
Lev01	<i>Candida famata</i>	99.9	0.83
Lev02	<i>Candida krusei</i>	87.1	0.14
Lev03	<i>Candida krusei</i>	99.9	0.1

#### B2. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas

En la identificación se utilizó el Kit API® 50CHL, el procedimiento se muestra en la Sección 4.4.2B. Las bacterias identificadas incluyeron las siguientes: *Carnobacterium maltoromaticum*, *Lactobacillus brevis* y *Weissella confusa*. La identificación se realizó con un porcentaje de proximidad relativa al taxón superior a 97%. Estos microorganismos están referencias en la literatura como homofermentativos y

heterofermentativos <sup>(40,66)</sup>. Las bacterias ácido lácticas son un grupo microbiano relacionado con la microflora intestinal de mamíferos. Muchos están relacionados con actividad probiótica e influyen favorablemente con la salud del hospedero <sup>(67)</sup>. La Tabla 7 muestra los resultados de identificación bioquímica.

Tabla 7: Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas utilizando el Kit API 50CHL.

<b>Código</b>	<b>Taxón significativo</b>	<b>Proximidad relativa al taxón indicado (%ID)</b>	<b>Proximidad al perfil más típico del Taxón (T)</b>
Bal01	<i>Carnobacterium maltoromaticum</i>	70.10	0.74
Bal02	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.9	0.61
Bal03	<i>Weissella confusa</i>	97	0.62

### 5.2.3 Identificación molecular

Luego de la identificación bioquímica se llevó a cabo la confirmación mediante pruebas moleculares de secuenciamiento 16S ARNr. El procedimiento de preparación de los cultivos se muestra en la Sección 4.5.1 De las levaduras evaluadas, se identificaron *Debaryomyces hansenii*, *Pichia kluyveri* y *Pichia krudiavzevii* mientras que de las bacterias lácticas se identificaron *Enterococcus thailandicus*, *Weissella paramesenteroides* y *Weissella cibaria*. Las demás cepas (dos de cada grupo) fueron identificadas como iguales a alguna de las anteriores. En la Tabla 8 se muestra los resultados de secuenciamiento para ambos grupos microbianos. Como se observa, la certeza de identificación es alta, lo que indica una alta confiabilidad. Comparando con los resultados obtenidos en la identificación

bioquímica es posible inducir que se tratan de especies similares, esto es: *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) y *Candida krusei* (*Pichia krudiavzevii*).

Tabla 8: Identificación molecular de levaduras y bacterias ácido lácticas mediante secuenciamiento 16S ARNr y 20S ARNr.

Código	Identificación	Match	Pct(%)
Lev01	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1324/1326	99
Lev02	<i>Pichia kluyveri</i>	1324/1325	99
Lev03	<i>Pichia krudiavzevii</i>	1325/1325	100
Bal01	<i>Enterococcus thailandicus</i>	1486/1486	100
Bal02	<i>Weissella paramesenteroides</i>	1495/1499	99
Bal03	<i>Weissella cibaria</i>	1502/1504	99

### 5.3 CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

#### 5.3.1 Crecimiento de levaduras

El crecimiento de las levaduras identificadas fueron evaluadas en un medio sintético de composición descrita en la 4. 2.1. En la figura 10 se muestra la cinética de crecimiento de *Debaryomyces hansenii*, *Pichia kluyveri* y *Pichia krudiavzevii*. Como se observa, tanto *Pichia kluyveri* como *Pichia krudiavzevii* presentan un mayor crecimiento comparado a *D. hansenii*. Asimismo, se observó una menor fase de adaptación por estas dos levaduras (3 horas). Esta característica es importante ya que indica una mayor capacidad de adaptación a las condiciones de cultivo consideradas. Adicionalmente se evaluó la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) de las levaduras ensayadas. Se ha observado mayores velocidades específicas de crecimiento en las cepas de *Pichia kluyveri* ( $0.140 \text{ h}^{-1}$ ) y *Pichia krudiavzevii* ( $0.128 \text{ h}^{-1}$ ) comparado a *Debaryomyces hansenii* ( $0.082 \text{ h}^{-1}$ ).



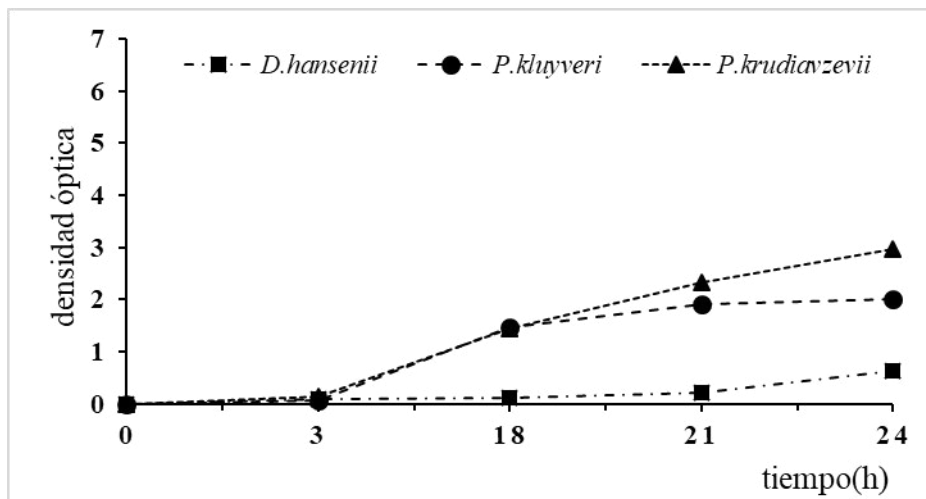


Figura 10. Cinética de crecimiento de levaduras cultivadas en medio sintético conteniendo 33.0 g/L de azúcar fermentable y pH 5.5.

### 5.3.2 Crecimiento de bacterias ácido lácticas

Las tres cepas de bacterias lácticas se cultivaron en medio sintético de composición descrita en la 4.2.2. Los resultados de la cinética de crecimiento se muestran en la Figura 11. Se observó un mayor crecimiento en términos de biomasa en *Weissella paramesenteroides* y *W. cibaria* comparado a *Enterococcus thailandicus*. Asimismo, la fase lag de las dos especies de *Weissella* fue menor (3 horas) comparado a la cepa de *Enterococcus thailandicus*. Con respecto a la velocidad de crecimiento específico, se observó que tanto la cepa de *Weissella paramesenteroides* como *Weissella cibaria* mostraron similares valores ( $0.161$  y  $0.137 \text{ h}^{-1}$  respectivamente), mientras que, la cepa de *Enterococcus thailandicus* presentó una menor velocidad específica de crecimiento ( $0.09 \text{ h}^{-1}$ ). Adicionalmente se observó que ambas especies de *Weissella* alcanzaron la fase estacionaria a las 15 horas de cultivo lo cual está relacionado con el agotamiento de la fuente de carbono (glucosa) o con la inhibición del crecimiento causado por el ácido láctico producido durante el crecimiento.

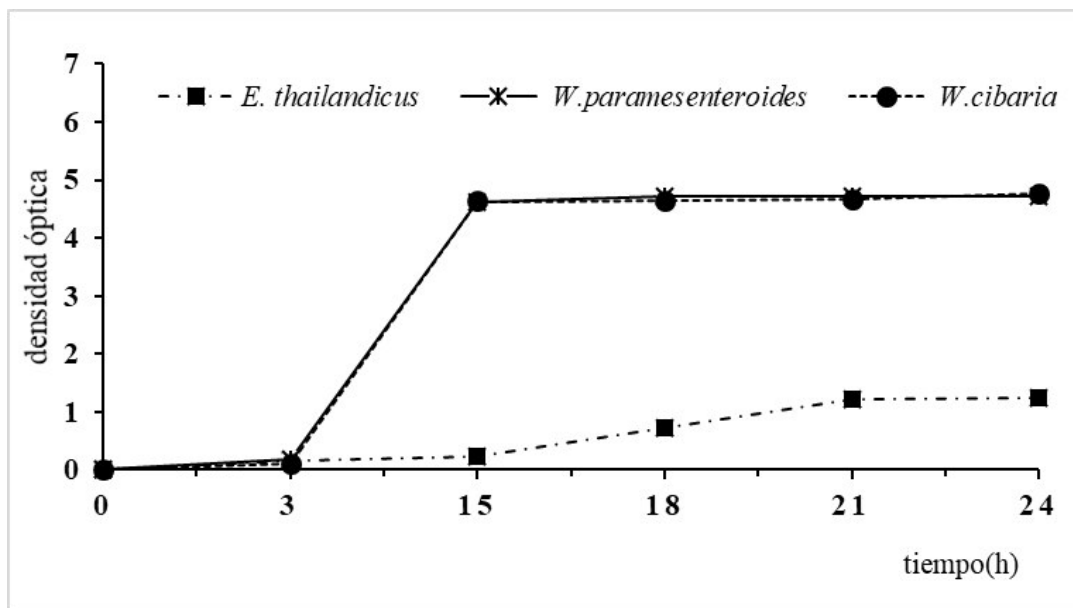


Figura 11. Cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas cultivadas en medio sintético conteniendo 20.0 g/L de azúcar fermentable y a pH 5.5.

## 5.4 ACTIVIDAD FERMENTATIVA DE MICROORGANISMOS

### 5.4.1 Fermentaciones con cultivos puros de levaduras

Las levaduras seleccionadas se han evaluado como cultivos puros con la finalidad de conocer sus características fermentativas tales como variación de pH (Figura 12) y consumo de azúcares reductores (Figura 13). Se ha observado una disminución de pH hasta valores de 3.5 hacia las 24 horas en el caso de *P. kudriavzevii* mientras que *P. kluyveri* hasta 3.4 hacia las 36 horas de cultivo. Por otro lado, *D. hansenii* logró acidificar el medio hasta alcanzar valores de pH de hasta 4.9. La variación del pH es un parámetro útil que permite determinar el tiempo de duración de la fermentación. Asimismo, se observa que ambas cepas de *Pichia* son capaces de acidificar mucho más comparado a *D. hansenii*.

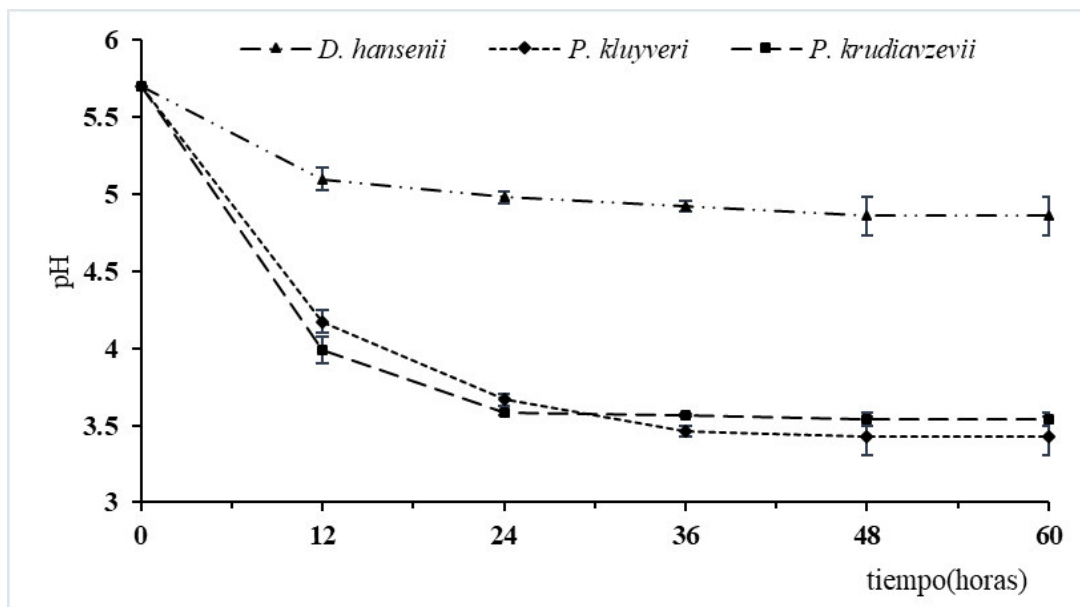


Figura 12. Variación del pH durante fermentaciones con cultivos puros de levaduras seleccionadas.

Los resultados del consumo de azúcares reductores (glucosa) por las tres levaduras ensayadas se muestran en la Figura 13. Se observó un mayor consumo de glucosa por *P. krudiavzevii* (28.68 g) seguido de *P. kluyveri* (26.22 g) comparado a *D. hansenii* (10 g). De acuerdo a los resultados obtenidos, la fermentación terminó a las 24 horas (*P. krudiavzevii*) mientras que en el caso de *P. kluyveri* a las 36 horas, por el contrario, la fermentación con *D. hansenii* terminó a las 36 horas con poco consumo de azúcar (8.45 g). Un aspecto importante a resaltar es la velocidad de consumo de azúcar durante las 24 horas de fermentación. Se observa que *P. krudiavzevii* presenta una mayor velocidad de consumo de azúcar comparado a las demás levaduras. Adicionalmente, se observa que los resultados de consumo de azúcar están en concordancia con la acidificación del medio para las tres especies de levadura (Figura 12).

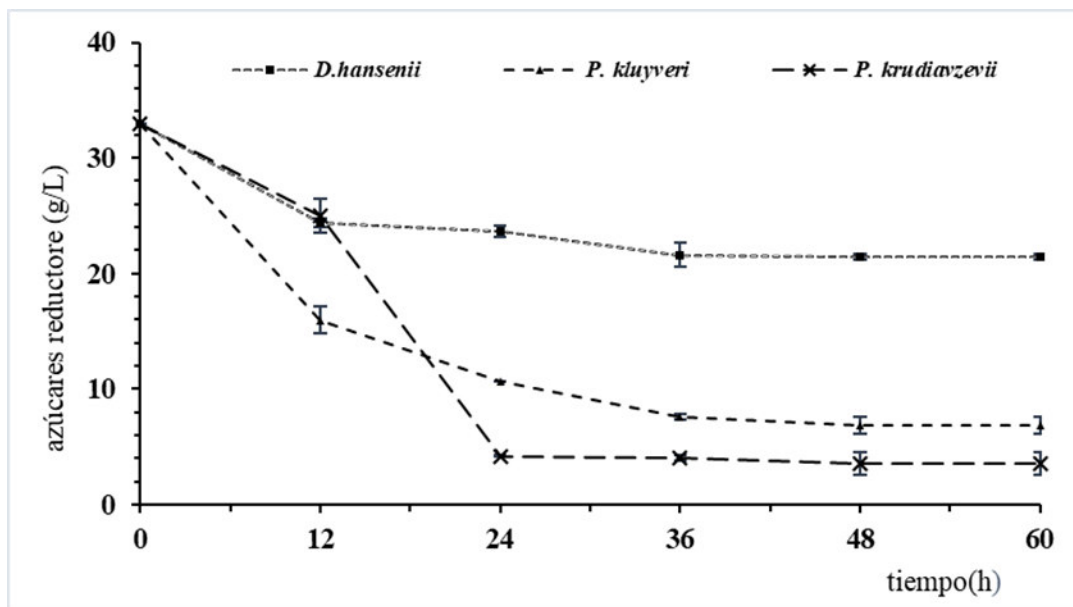


Figura 13. Cinética de consumo de azúcares reductores por levaduras ensayadas como cultivos puros.

#### 5.4.2 Fermentaciones con cultivos puros de bacterias ácido lácticas

Los resultados de la variación de pH durante la fermentación en medio sintético con bacterias lácticas se muestran en la Figura 14. Se observó una mayor acidificación del medio por *W. cibaria* ( $\text{pH}=4.32 \pm 0.14$ ) seguido de *W. paramesenteroides* ( $4.32 \pm 0.22$ ). La menor acidificación del medio se observó con *E. thailandicus* ( $4.52 \pm 0.02$ ). Por el contrario, la mayor velocidad de acidificación del medio se produjo con *W. cibaria* (hasta 12 h), seguido de las cepas de *W. paramesenteroides* y *E. thailandicus* (hasta 48 h). La acidificación del medio está relacionada con la producción de ácido láctico, metabolito principal de las bacterias lácticas. De los resultados obtenidos se puede indicar que la cepa de *W. cibaria* presenta mejores características de acidificación del medio comparado a *W. paramesenteroides* y *E. thailandicus*.

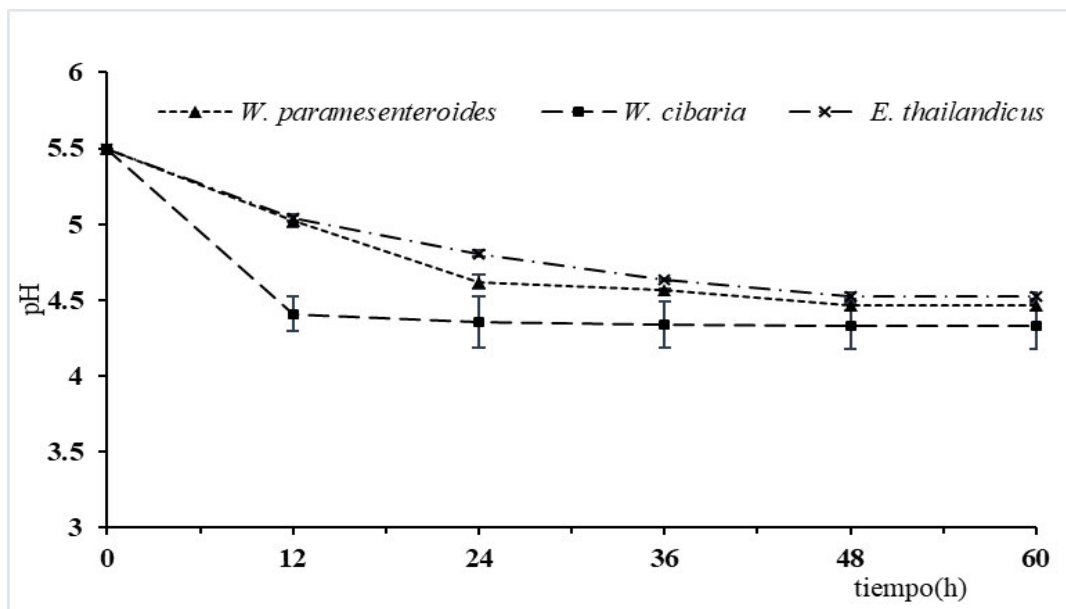


Figura 14. Variación del pH durante fermentaciones con cultivos puros de bacterias ácido lácticas cultivadas en medio sintético.

Los resultados del consumo de azúcares por BAL se muestran en la Figura 15. Se observó un perfil de consumo de glucosa similar por *E. thailandicus* y *W. paramesenteroides* (10.47 y 10.55 g respectivamente) hacia las 48 horas de cultivo. Sin embargo, *W. cibaria* consumió la mayor cantidad de azúcar (16.08 g). Un mayor consumo de azúcares es una característica interesante ya que indicaría una mayor producción de ácido láctico. La mayor velocidad de consumo de azúcar (glucosa) se produjo con *W. cibaria* hacia las 12 horas, mientras que las demás cepas presentaron una menor velocidad hacia las 48 horas. La presencia de azúcar residual indica que las bacterias ensayadas no son capaces de consumir totalmente la fuente de carbono, y podría ser debido al efecto inhibitor del ácido láctico, producido durante la fermentación.

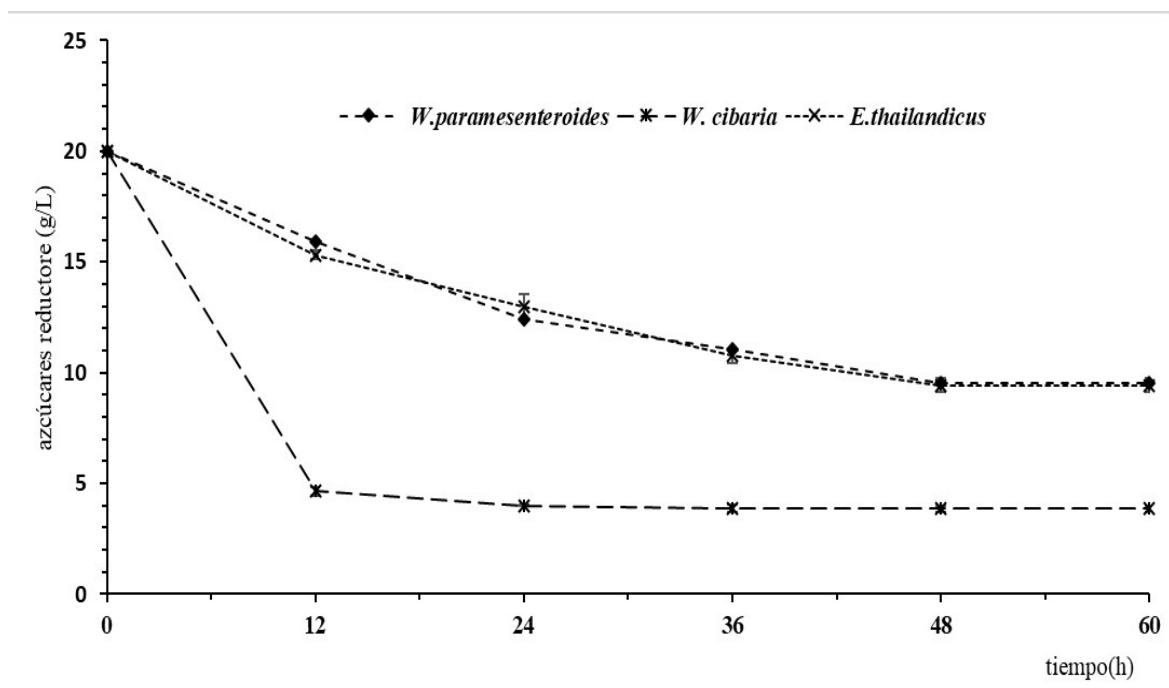


Figura 15. Cinética de consumo de azúcares reductores por

Bacterias ácido lácticas como cultivos puros.

Los resultados de producción de ácido láctico durante la fermentación se muestran en la Figura 16. Se observó una mayor producción con *W. cibaria* ( $11.30 \pm 0.14$  g/L), seguido de *E. thailandicus* ( $10.38 \pm 0.02$  g/L) y *W. paramesenteroides* ( $10.24 \pm 0.02$  g/L). Asimismo, la mayor velocidad de producción de ácido láctico se observó con *W. cibaria* hacia las 12 horas de cultivo. *W. paramesenteroides* y *E. thailandicus* mostraron un comportamiento similar alcanzado la mayor producción hacia las 48 horas de cultivo. En base a las relaciones estequiométricas se observa un mayor consumo de azúcar en correspondencia con la producción de ácido láctico. Esto se debería a que durante la fermentación una proporción de fuente de carbono sirvió para la producción de CO<sub>2</sub> y biomasa. Adicionalmente, es necesario indicar que el ácido láctico producido durante la fermentación ejerce su efecto inhibitorio a medida que incrementa su concentración, dando como resultado el detenimiento de la

actividad fermentativa y una observancia de azúcar residual hacia el final de la fermentación.

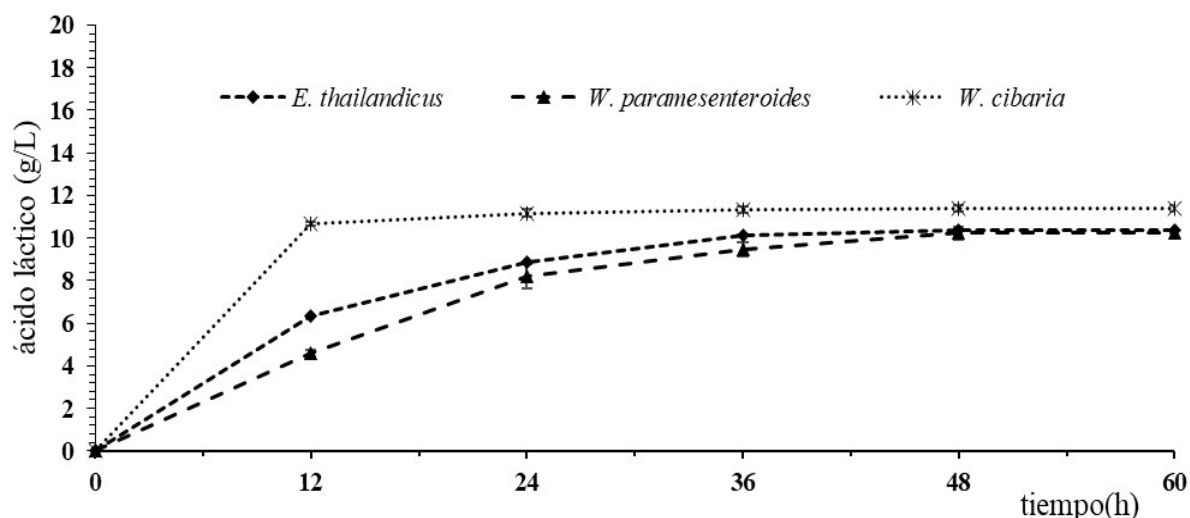


Figura 16. Cinética de producción de ácido láctico por cultivos puros de bacterias ácido lácticas.

#### 5.4.3 Fermentaciones con cultivos mixtos

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento se han evaluado la actividad fermentativa de cultivos mixtos utilizando las siguientes combinaciones: *D. hansenii*/*E. thailandicus*, *W. paramesenteroides*/*P. kluyveri*, *W. cibaria*/*P. krudiavzevii*, *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii*, *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria* y *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii*/*E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*. Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 17, 18 y 19. Con respecto a la variación de pH (Figura 17) se observó un comportamiento diferente comparado a los cultivos puros de ambos grupos microbianos (Figura 12 y 14). Los cultivos *W. paramesenteroides*/*P. kluyveri*, *W. cibaria*/*P. krudiavzevii*, *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii* y *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii*/*E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*

disminuyeron el pH a valores alrededor de 4.0 en 36 horas, mientras que el cultivo *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria* alcanzo un pH final de 4.0 en 48 horas. El cultivo *D. hansenii*/*E. thailandicus* mostró una menor disminución de pH (hasta  $4.52 \pm 0.03$ ) hacia las 48 horas de cultivo. Por otro lado, los cultivo *W. cibaria*/*P. krudiavzevii* y *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii*/*E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*., *W. paramesenteroides*/*P. kluyveri* y *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii*, *D. hansenii*/*E. thailandicus* y *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria* mostraron perfiles de disminución de pH similares hacia las 24 horas. Asimismo, se observa una mayor velocidad de acidificación para todos los cultivos durante las 24 horas siendo mayor de los cultivos *W. cibaria*/*P. krudiavzevii* y *D. hansenii*/*E. thailandicus*. La producción de ácidos orgánicos por los microorganismos involucrados es en gran medida responsable de la disminución del pH. Las levaduras por ejemplo producen principalmente ácido acético mientras que las bacterias lácticas producen principalmente ácido láctico. Así la suma de ambos ácidos orgánicos tiene efecto en la variación del pH a las condiciones ensayadas. La disminución del pH está en relación con la capacidad del microorganismo de tolerar los ácidos que producen, siempre y cuando haya exceso de fuente de carbono. La diferencia en los perfiles de variación de pH entre cultivos puros de levadura y bacterias lácticas con los cultivos mixtos se debe al efecto de interacción entre las dos cepas juntas que puede resultar en una mayor o menor acidificación del medio.



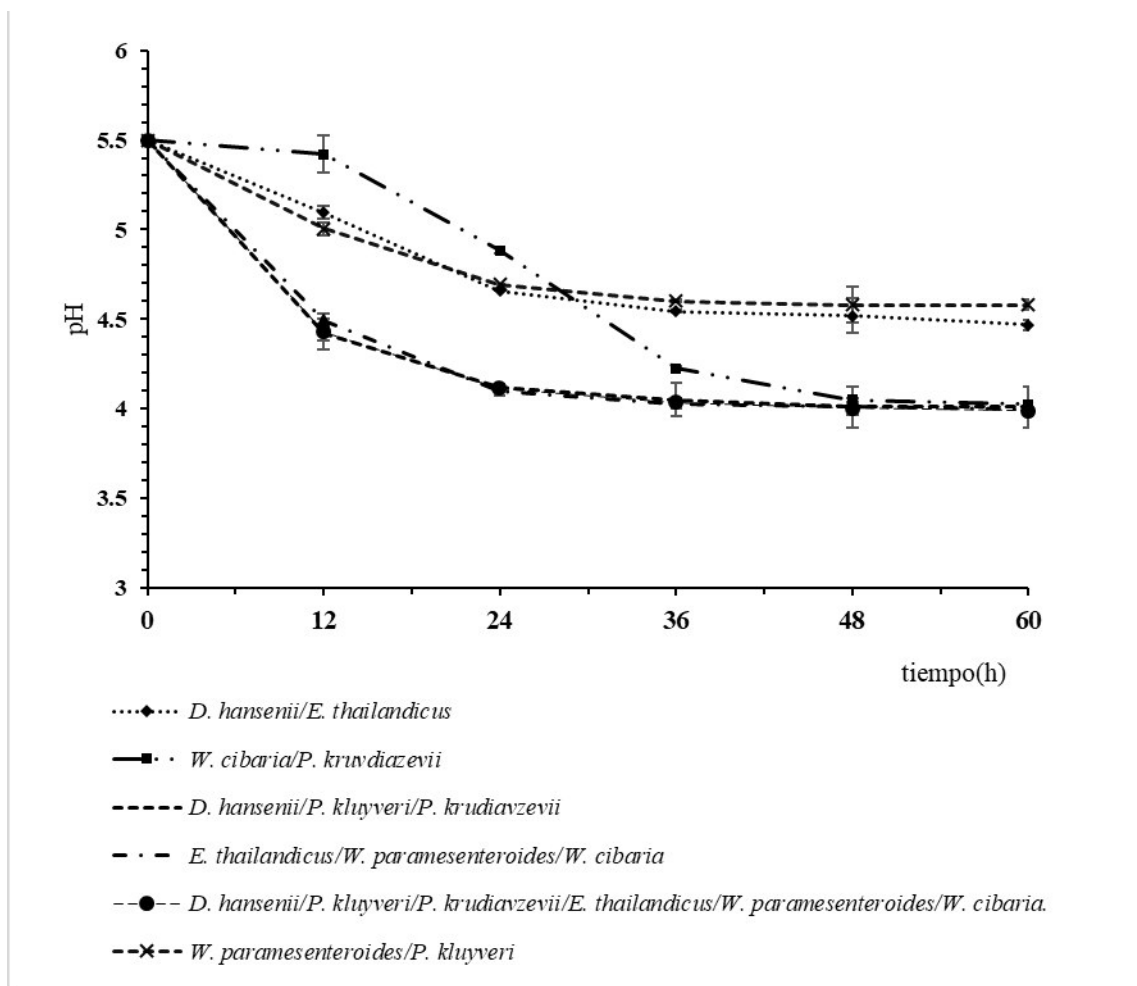


Figura 17. Cinética de variación de pH por cultivos mixtos de bacterias ácido lácticas y levaduras.

Asimismo, se evaluó el consumo de azúcares durante la fermentación. Los resultados se muestran en la Figura 18. Se observó que el cultivo de *W. paramesenteroides*/*P. kluyveri* mostró un mayor consumo de azúcares (46.64 g. glucosa) y una mayor velocidad de consumo durante las 12 horas de cultivo comparado a los demás cultivos. Seguidamente los cultivos *D. hansenii*/*E. thailandicus*, *W. cibaria*/*P. kudriavzevii* y *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. kudriavzevii*/*E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria* presentaron una mayor velocidad de

consumo de azúcar comparado con los cultivos *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii* y *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria* durante las 12 horas. Por otro lado, los cultivos *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii* y *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria* presentaron un lento consumo durante las 12 horas de cultivo. Adicionalmente se observó que las fermentaciones terminaron a las 12 horas (*W. cibaria*/*P. krudiavzevii*), 24 horas (cultivo *W. paramesenteroides*/*P. kluyveri* y *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*), 36 horas (cultivos *D. hansenii*/*E. thailandicus* y *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii*/*E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*) y 48 horas (cultivo *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii*). Con respecto a la cantidad de azúcar consumido, el cultivo de *D. hansenii*/*E. thailandicus* mostró un consumo de 30.88 g. de azúcar, el cultivo *W. cibaria*/*P. krudiavzevii*, 22.15 g., el cultivo *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii*, 34.59 g., el cultivo *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*, 25.28 g. y, el cultivo *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii*/*E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*, 30.48 g. de azúcar. El consumo de la fuente de carbono está relacionado con la capacidad del microorganismo para metabolizarlo y convertirlo en sub-productos de la fermentación. Así, la acumulación de uno de ellos puede tener efecto negativo en el proceso fermentativo y detener la actividad celular. El azúcar residual al final de la fermentación, es indicativo de que la fermentación ha sido incompleta.

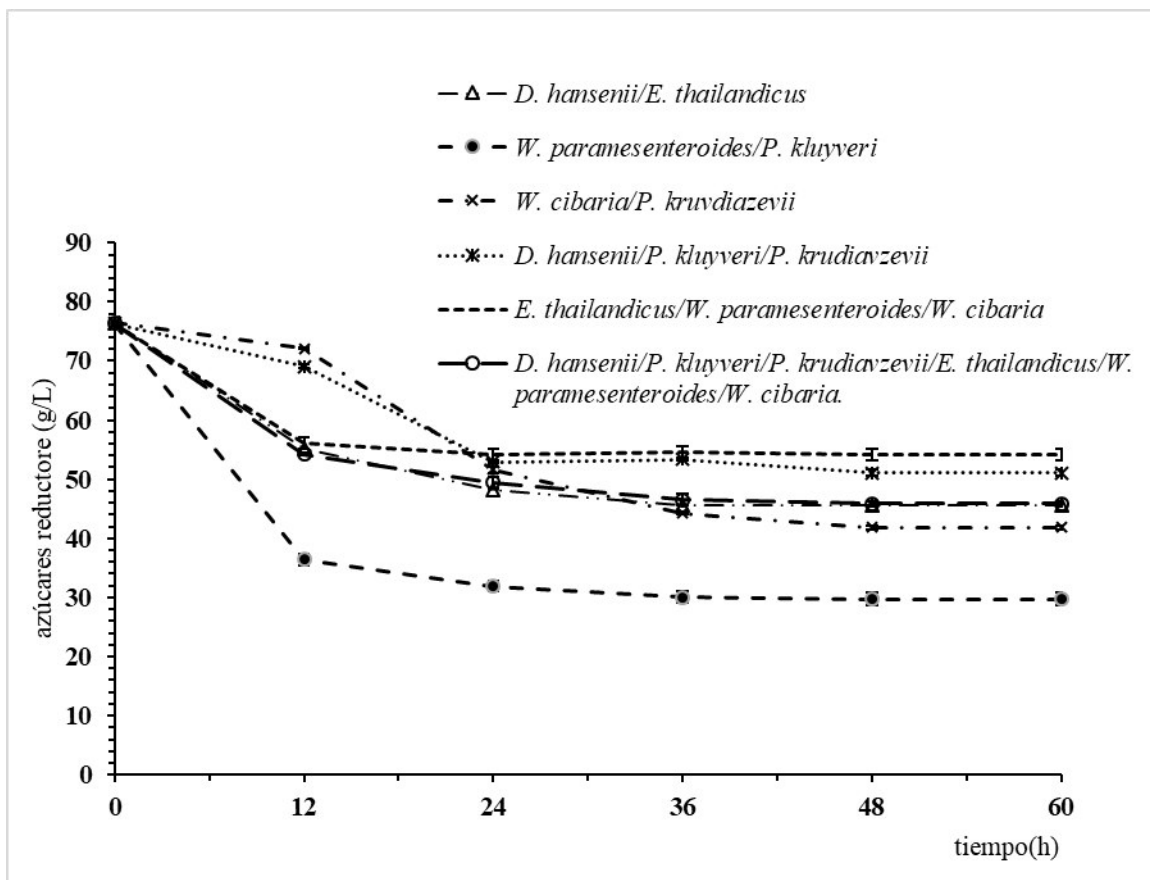


Figura 18. Cinética de consumo de azúcares reductores por cultivos mixtos de bacterias ácido lácticas y levaduras.

Los resultados de producción de ácido láctico con cultivos mixtos se muestran en la Figura 19. Se observó una mayor producción de ácido láctico con el cultivo *D. hansenii/E. thailandicus* ( $10.56 \pm 0.79$  g/L), seguido del cultivo con *D. hansenii/P. kluyveri/P. krudiazzevii/E. thailandicus/W. paramesenteroides/W. cibaria* ( $8.9 \pm 0.05$  g/L), cultivo *W. cibaria/P. krudiazzevii* ( $8.55 \pm 0.24$  g/L), cultivo “*E. thailandicus/W. paramesenteroides/W. cibaria*” ( $8.45 \pm 0.1$  g/L) y finalmente con el cultivo “*W. paramesenteroides/P. kluyveri*” ( $6.44 \pm 0.04$  g/L). La producción de ácido láctico está relacionada con la capacidad del microorganismo para convertir el azúcar fermentable en ácido láctico y tolerar altas concentraciones de su metabolito. En todos los cultivos la mayor producción se alcanzó entre las 36 y 48 horas.

Estequiométricamente la concentración de ácido láctico está en relación con la cantidad de azúcar utilizado. Sin embargo, el desacople de dicha relación podría deberse a la producción de biomasa y otros sub-productos de la fermentación como resultado de la actividad fermentativa de los microorganismos diferentes a las bacterias lácticas presentes en el cultivo mixto.

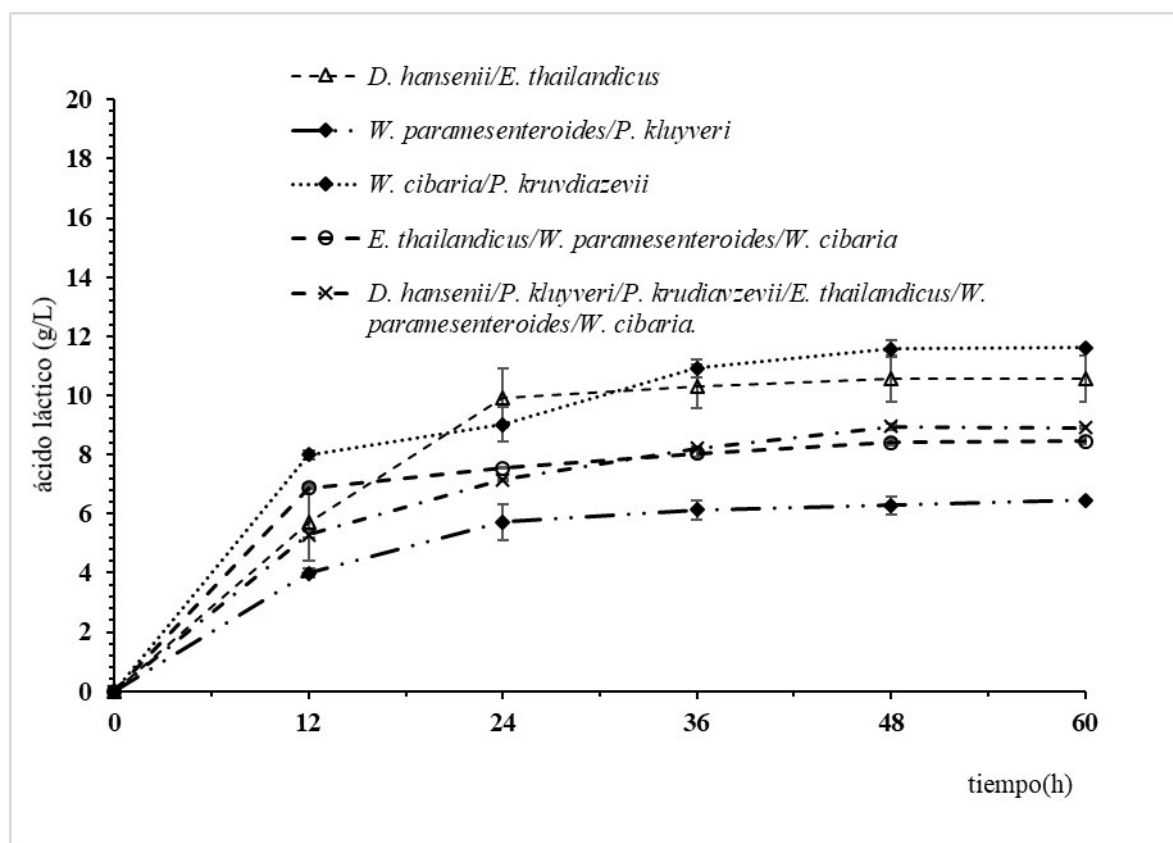


Figura 19. Cinética de producción de ácido láctico por cultivos mixtos de bacterias ácido lácticas y levaduras.

## 5.5 PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES

Los experimentos de producción de compuestos química que tienen impacto en la calidad sensorial se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en la Sección 4.8.2 y 4.8.3. Se analizaron la producción de alcoholes superiores y ésteres en cultivos puros y mixtos. Los resultados de cultivos puros se muestran en la Tabla 9. Se observó un mayor consumo de extracto seco en especies de *Pichia kluyveri* y *Pichia krudiavzevii* considerando su concentración inicial. Adicionalmente, se observó una mayor acidificación del medio con la cepa de *W. paramesenteroides*. La producción de alcoholes superiores se observó con las levaduras de *P. kluyveri* y *P. krudiavzevii* y la producción de ésteres se observó en las tres especies de levaduras ensayadas. Por otro lado, la especie mayor productora de alcohol fue *P. kluyveri*. El comportamiento fermentativo de *E. thailandicus* y *W. cibaria* fueron similares. En base a los resultados de producción de alcohol obtenidos, *W. paramesenteroides* presentó un comportamiento heterofermentativo mientras que *E. thailandicus* y *W. cibaria* un comportamiento homofermentativo. Un aspecto resaltante en estos cultivos es la ausencia de alcoholes superiores tales como butanol, isobutanol, propanol, isopropanol. Con respecto a la producción de etil acetato, las especies de levaduras fueron las únicas en producir este compuesto importante desde el punto de vista sensorial. Con respecto al consumo de extracto seco por parte de las bacterias lácticas, las tres especies presentaron un perfil similar de consumo de extracto seco. Asimismo, la producción de acidez volátil está relacionada con la producción de ácido acético. La ausencia en *E. thailandicus* y *W. cibaria* es debido a que presentarían un metabolismo homofermentativo. Por otro lado, la ausencia de producción de ésteres por las bacterias lácticas se debería a la incapacidad de producir enzimas que sintetizan estos compuestos volátiles.

Tabla 9. Producción de compuestos químicos por bacterias ácido lácticas y levaduras como cultivos puros.

Compuesto (mg/100ml alcohol anhidro)	<i>E.</i> <i>thailandicus</i>	<i>W.</i> <i>paramesenteroides</i>	<i>W.</i> <i>cibaria</i>	<i>D.</i> <i>hansenii</i>	<i>P.</i> <i>kluyveri</i>	<i>P.</i> <i>krudiavzevii</i>
<b>Alcohol isoteramilico</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	177.8	n.d
<b>Alcoholes superiores totales</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	177.8	0.0
<b>Etil acetato</b>	n.d	n.d	n.d	1001.8	1624.7	566.2
<b>Isoamil acetato</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Ésteres totales</b>	0.0	0.0	0.0	1001.8	1624.7	566.2
<b>Acidez volátil</b>	n.d	202849.3	n.d	2054.9	394.6	446.9
<b>Extracto seco (g/L)</b>	58.5	59.4	58.0	22.7	8.4	18.9
<b>Grado alcohólico</b>	0.0	0.07	0.0	0.4	1.1	n.d

Los resultados de los cultivos mixtos se muestran en la Tabla 10. Se observa un mayor consumo de extracto seco en el cultivo con *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii* mientras que, por el contrario, la combinación que consumió menos extracto seco fue *W. cibaria*/*P. krudiavzevii*. El consumo de extracto seco sería un indicativo del grado de metabolismo de los componentes del medio incluido la fuente principal de carbono. La producción de alcoholes superiores y ésteres se observó en los cultivos con *P. kluyveri*/*W. paramesenteroides*, *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii* y *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*. Adicionalmente, los cultivos *W. cibaria*/*P. krudiavzevii* y *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii*/*E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria* no produjeron acidez volátil. La interacción entre microorganismos es un mecanismo complejo que aún está en estudio y depende de las especies involucradas. Sin embargo, se considera que existe un mecanismo de comunicación entre ellas que les permite programar su actividad metabólica. Adicionalmente, como resultado de la interacción una especie podría verse favorecida frente a otra y prevalecer su metabolismo frente a la de otra. Adicionalmente, la producción de sub productos del metabolismo fermentativo de una especie podría afectar la actividad de otra restringiendo su desarrollo. La mayor producción de alcohol se observó en el cultivo *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*. Un comportamiento interesante se observó en el cultivo *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii*/*E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*, en el cual no se observó producción de alcohol, alcoholes superiores, ésteres ni acidez volátil, pero si una disminución del contenido del extracto seco, lo que indicaría que, la cantidad consumida de este último habría sido destinada a la producción de biomasa y ácido láctico principalmente.

Tabla 10. Producción de compuestos químicos de bacterias ácido lácticas y levaduras como cultivos mixtos.

Compuesto (mg/100ml alcohol anhidro)	<i>D. hansenii/E. thailandicus</i>	<i>P. kluyveri/ W. parames enteroides</i>	<i>W. cibaria/P. krudiavze vii</i>	<i>D. hansenii/P. kluyveri/P. krudiavze vii</i>	<i>E. thailandicus/W. paramesentero ides/W. cibaria</i>	<i>D. hansenii/P. kluyveri/P. krudiavzevii/E. thailandicus/W. paramesenteroides/W. cibaria</i>
<b>Alcohol isoteramilico</b>	1186.1	658.4	n.d	395.7	416.5	n.d
<b>Alcoholes sup. totales</b>	1186.1	658.4	0.0	395.7	416.5	0.0
<b>Etil acetato</b>	n.d	994	n.d	522.9	696.7	n.d
<b>Isoamil acetato</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Ésteres totales</b>	0.0	994.0	0.0	522.9	696.7	0.0
<b>Acidez volátil</b>	87903.3	39154	n.d	333231.8	29515.5	n.d
<b>Extracto seco (g/L)</b>	97.1	96.0	105.1	62.4	68.7	94.4
<b>Grado alcohólico</b>	0.13	0.33	n.d	0.4	0.47	0.0



## VI. DISCUSIÓN

Existen muy pocos estudios sobre aislamiento de microorganismos a partir de heces de mamíferos de sangre caliente, limitando la comparación con estudios similares. Se reporta por primera vez el aislamiento de microorganismos a partir de heces de coatí de cola anillada (*Nasua nasua*) de importancia biotecnológica. Para ello se utilizaron medios de cultivos selectivos tales como agar OGYE para levaduras, la oxitetraciclina inhibe el crecimiento de especies de *Enterococcus*, permitiendo solo el crecimiento de levaduras y algunos posibles hongos filamentosos y bacilos en concordancia con lo reportado por Mossel et al.1970 <sup>(45)</sup>. Se empleó agar MRS con vancomicina el cual limita el crecimiento de bacterias Gram negativas y facilita el crecimiento de bacterias lácticas permitiendo aislar selectivamente como sugiere Mathot et al.1994 <sup>(46)</sup>.

La identificación de los microorganismos aislados se realizó mediante pruebas bioquímicas y moleculares. Preliminarmente las colonias aisladas tanto de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras se evaluaron mediante tinción Gram, test de catalasa y análisis morfológico por microscopía óptica. Estos análisis han sido reportados ser útiles y necesarios para una evaluación preliminar en manuales como Spencer J y Spencer D 2006 y Bergeys 1986<sup>(47)</sup> <sup>(49)</sup>. En base a los resultados, las levaduras aisladas presentaron una morfología redonda y ovalada con una reproducción por gemación permitiendo una fácil identificación de su morfología, característica sugerida por Spencer J y Spencer D 2006 <sup>(47)</sup>. Las bacterias lácticas por otro lado mostraron una morfología bacilar, cocal formando cadenas y diplococos similar a lo indicado en el manual de Bergeys 1986 <sup>(49)</sup>.

Como resultado de las pruebas bioquímicas (utilizando el Kit API ID 32C) realizadas a levaduras aisladas se identificaron especies de *Candida famata* y *C. krusei* alcanzando un porcentaje de proximidad al taxón igual a 99.9%. Mediante el análisis molecular (26S ARNr) se identificaron como *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426 (anamorfo *Candida famata*), *Pichia kluyveri* NRRL Y-11519 y *Pichia kudriavzevii* NRRL Y-11519 (anamorfo *Candida krusei*). Estudios realizados por Gouliamova et al.

2012 y Hallen-Adams et al. 2016 reportaron el aislamiento e identificación de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Galactomyces geotrichum*, y algunas especies de *Debaryomyces* entre ellas *D. hansenii* a partir de mamíferos tales como jaguares, elefantes, kanguros, zebras y humanos <sup>(68,69)</sup>. Según los resultados obtenidos, la presencia de *Debaryomyces hansenii*, *Candida krusei* y *Candida krudiazzevii* en las heces del coatí de cola anillada estaría relacionado con la dieta diaria a base de frutos maduros de café que al ser ingeridos logran atravesar el tracto digestivo, ya que estos son comúnmente encontrados en frutos y hojas según Kurtzman 2011<sup>(70)</sup>. Con respecto a la identificación bioquímica de las bacterias ácido lácticas (Kit API 50CHL) aisladas, se identificaron dos de tres bacterias entre ellas *Lactobacillus brevis* y *W. confusa* con porcentajes de proximidad al taxón de 99.9 y 97% respectivamente. Sin embargo, al realizar análisis moleculares (16S ARNr) se encontraron taxones diferentes tales como *Enterococcus thailandicus*, *W. paramesenteroides* y *W. cibaria*. Las limitaciones en la identificación de microorganismos mediante pruebas bioquímicas utilizando el Kit API han sido reportadas anteriormente en estudios realizados por Milliere et al.1989 y Björkroth et al. 2002<sup>(71,72)</sup>. En estudios realizados por Endo et al. 2010 se reportaron la presencia de bacterias ácido lácticas en heces de mamíferos de la misma familia tal como *Procyron* <sup>(30)</sup>. La presencia de BAL en el sistema digestivo del coatí de cola anillada estaría relacionada con la flora endógena natural de mamíferos de sangre caliente como lo reportan Beasley et al. 2006 y Nelson et al. 2013 <sup>(73,74)</sup>. Por ejemplo, se ha reportado la ocurrencia de *Enterococcus thailandicus*, una bacteria láctica común de la flora intestinal de mamíferos como lo sugiere Devriese et al. 1987 y Henning et al. 2015 <sup>(75,76)</sup>.

Un aspecto importante en el estudio de microorganismos con potencial fermentativo es su capacidad de crecimiento, el cual está determinado por la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) observado en la fase de crecimiento exponencial (Heller K, 2001) <sup>(77)</sup>. De los resultados obtenidos durante el cultivo de levaduras a condiciones similares se observó que *P. kluyveri* y *P. krudiazzevii* mostraron una mayor tasa de crecimiento comparado a *D. hansenii*, dentro de las 24 horas de cultivo evaluado. Asimismo, *D.*

*hansenii* mostró un mayor tiempo de adaptación a las condiciones de cultivo comparado a las otras dos levaduras estudiadas. La capacidad de crecimiento de los microorganismos está influenciada por múltiples factores entre ellos, el requerimiento nutritivo, la temperatura y pH de cultivo, la concentración de azúcar, oxígeno en el medio, entre otros (Jay et al. 2005) <sup>(78)</sup>. Adicionalmente, bajo las condiciones ensayadas ambas especies de *Pichia* mostraron similares valores de tasa de crecimiento específico ( $0.140\text{ h}^{-1}$  y  $0.128\text{ h}^{-1}$ ). Por otro lado, el cultivo de bacterias lácticas a condiciones similares mostró diferencias importantes en los valores de tasa específica de crecimiento. Por ejemplo, *W. cibaria* ( $0.161\text{ h}^{-1}$ ) y *W. paramesenteroides* ( $0.137\text{ h}^{-1}$ ) mostraron tasas de crecimiento específico mayores que *E. thailandicus* ( $0.09\text{ h}^{-1}$ ). Con respecto a la fase de adaptación, bajo las condiciones ensayadas, las tres cepas mostraron un tiempo similar (3 horas). Desde el punto de vista tecnológico, se prefiere aquellas cepas que presenten una mayor capacidad de adaptación al medio de cultivo, criterio similar tomado en estudios de Evangelista et al. 2014, Patel et al. 2013 y Romano et al. 1997 <sup>(26,79 y 80)</sup>.

Otro aspecto evaluado es el comportamiento fermentativo de las levaduras y bacterias lácticas aisladas. En el caso de levaduras se determinó la cinética de consumo de azúcares y la acidificación del medio medido indirectamente a través de la variación del pH. En el caso de las levaduras ensayadas como cultivo puro se observó un mayor consumo de azúcares fermentables (glucosa) por *P. kluyveri* y *P. krudiazzevii* comparado a *D. hansenii*, el cual se correlaciona con la disminución del pH hasta valores cercanos a 3.5. El descenso de pH durante el cultivo está relacionado con la producción de ácidos orgánicos por las levaduras principalmente ácido acético producto común reportado en otros estudios como Romano et al. 1997 y Flores et al. 2000 <sup>(80,81)</sup>. Un aspecto importante a resaltar es la concentración de azúcar residual al final del cultivo con *P. kluyveri* el cual es mayor a lo observado con *P. krudiazzevii*, lo cual indicaría que esta última levadura presenta una menor afinidad al sustrato entre otros aspectos influyentes comparado a *P. kluyveri*. Con respecto a la actividad fermentativa de las BAL ensayadas como cultivos puros se observó un mayor consumo de sustrato por *W. cibaria* comparado a *W.*

*paramesenteroides* y *E. thailandicus*. El mayor consumo de sustrato observado estaría relacionado con la afinidad del microorganismo por el sustrato y a las condiciones de cultivo empleado en los experimentos. Desde el punto de vista tecnológico, se prefieren microorganismos que presenten una mayor capacidad de consumo de sustrato ya que influye en el tiempo de fermentación. Sin embargo, la capacidad de consumo de azúcar por BAL está relacionado también con otros factores tales como el efecto inhibidor de sub productos de la fermentación (ácido láctico), el cual impediría el consumo adicional del azúcar durante el cultivo (Kim et al. 2017) <sup>(82)</sup>. En base a los resultados obtenidos, se muestra que, de las tres cepas ensayadas *W. cibaria* presentó una mayor disminución de pH indicando una mayor producción de ácido láctico. En BAL tanto homofermentativas como heterofermentativas el azúcar (glucosa) es principalmente es convertido en ácido láctico (Kleerebezem et al. 2003) <sup>(83)</sup>. Con respecto a la producción de ácido láctico se observó una producción de alrededor de 11 g/L en las tres cepas ensayadas. De acuerdo a la literatura (Björkroth et al. 2006), una mayor producción de ácido láctico ha sido reportado por otras cepas de BAL <sup>(66)</sup>, siendo la primera vez que se reporta la producción de ácido láctico en *E. thailandicus*.

Asimismo, se evaluó el comportamiento fermentativo de co-cultivos entre levaduras y BAL. En todos los ensayos se observó un comportamiento diferente comparado a los cultivos puros. Se observó un mayor consumo de azúcares en cultivo mixto con *P. kluyveri* y *W. paramesenteroides* comparado a los demás cultivos ensayados. Asimismo, la mayor disminución de pH se observó en el cultivo con *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiazzevii*/*E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*. Es necesario indicar que tanto el consumo de azúcares y la disminución de pH es el resultado de la interacción compleja de todos los microorganismos presentes en el cultivo. Así, la disminución del pH por ejemplo está relacionado con la producción de ácidos orgánicos tanto por levaduras y/o BAL. Un aspecto interesante observado es la cantidad de azúcar residual al final del cultivo en todos los ensayos realizados. La cantidad de azúcar no utilizado (mayor a 30 g/L) indicaría que un mayor número de microorganismos presentes en el cultivo no asegura un consumo total de la fuente de

carbono. En algunos cultivos, por ejemplo, el consumo de azúcar ha sido muy poco como en el caso de *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*. Este comportamiento también se ha observado en la producción de ácido láctico, cuya mayor producción se ha observado en el cultivo con *W. cibaria*/*P. krudiyavzevii* (alrededor de 12 g/L). Sin embargo, las cantidades producidas en los ensayos realizados son menores a las reportadas en Patel et al. 2013 con cultivos puros de otros microorganismos tales como BAL <sup>(79)</sup>.

Adicionalmente se evaluó la producción de compuesto volátiles por cultivos puros y mixtos de los microorganismos en estudio utilizando medio sintético. Los resultados mostraron la producción de alcoholes superiores (alcohol isoteramilico) sólo por *P. kluyveri*. Asimismo, la producción de ésteres, principalmente etil acetato se observó sólo en las tres levaduras ensayadas (*P. kluyveri*, *D. hansenii* y *P. krudiyavzevii*) comparadas con las cepas de BAL. La producción de alcoholes superiores y ésteres está relacionado con la actividad de enzimas específicas presentes en levaduras y probablemente ausentes en las cepas de BAL ensayadas. Por otro lado, se observó la producción de alcohol en cultivos puros de *P. kluyveri*, *D. hansenii* y *W. paramesenteroides*. La ausencia de producción de etanol en *W. cibaria* está relacionado con un comportamiento homofermentativo. Sin embargo, esta cepa es indicada por Björkroth et al. 2002 como una BAL heterofermentativa <sup>(72)</sup>. Con respecto a los cultivos mixtos, se observó la producción de alcoholes superiores (alcohol isoteramilico) en los cultivos con *D. hansenii*/*E. thailandicus*, *P. kluyveri*/*W. paramesenteroides*, *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiyavzevii* y *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria* el cual sería producto de una interacción compleja entre microorganismos. Por otro lado, la producción de ésteres (etil acetato) se observó en cultivos con *P. kluyveri*/*W. paramesenteroides*, *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiyavzevii* y *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*. Los ésteres a diferencia de los alcoholes superiores son responsables de impartir aromas frutales en muchos alimentos y bebidas fermentadas como lo indica Loviso et al. 2018<sup>(84)</sup>. Sin embargo, desde el punto de vista tecnológico una producción balanceada de ésteres y alcoholes superiores por microorganismos es deseada. Finalmente, se ha

observado la producción de acidez volátil en algunos cultivos puros y mixtos. Cabe indicar que la acidez volátil está relacionada con la producción de ácido acético observado en levaduras y BAL heterofermentativas como han sido indicados por Jolly et al. 2006 Loviso et al 2018 y Ciani et al. 2008 <sup>(41,84 y 85)</sup>.

## VII. CONCLUSIONES

- Se aisló e identificó las siguientes especies de levaduras *Debaryomyces hansenii*, *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevii*, y especies de bacterias ácido lácticas tales como *Enterococcus thailandicus*, *W. paramesenteroides* y *W. cibaria*, los cuales fueron identificados mediante análisis molecular 26S ARNr y 16S ARNr respectivamente.
- La tasa de crecimiento específico de las levaduras estudiadas fue *D. hansenii* ( $0.082\text{ h}^{-1}$ ), *P. kluyveri* ( $0.140\text{ h}^{-1}$ ) y *P. kudriavzevii* ( $0.128\text{ h}^{-1}$ ). Asimismo, las especies de bacterias lácticas presentaron las siguientes tasas de crecimiento *E. thailandicus* ( $0.09\text{ h}^{-1}$ ), *W. cibaria* ( $0.137\text{ h}^{-1}$ ) y *W. paramesenteroides* ( $0.161\text{ h}^{-1}$ ).
- El comportamiento fermentativo de los cultivos puros y mixtos fue el siguiente: se concluyó que, de los cultivos puros de levaduras, *P. kluyveri* y *P. kudriavzevii* presentan mayor consumo de azúcares y acidificación del medio en menor tiempo. De las bacterias lácticas estudiadas se concluyó que, *W. cibaria* presentaron mayor consumo de azúcares, disminución de pH y una mayor producción de ácido láctico. Asimismo, se observó un mayor consumo de azúcares en cultivos mixtos con *P. kluyveri*/*W. paramesenteroides*. Asimismo, la mayor disminución de pH se observó en los ensayos con cultivos mixtos de *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. kudriavzevii*/*E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria* en comparación con los demás cultivos mixtos ensayados. Adicionalmente, la mayor producción de ácido láctico se observó en el cultivo mixto con *W. cibaria*/*P. kudriavzevii*.
- Al analizar los fermentos mediante cromatografía de gases se determinó que, *P. kluyveri* es capaz de producir alcohol isoteramílico, mientras que, *D. hansenii*, *P. kudriavzevii* y *P. kluyveri* fueron capaces de producir etil acetato, el cual es el éster más importante desde el punto de vista sensorial. Con respecto a la producción de compuestos volátiles por cultivos mixtos, se observó la producción de alcoholes

superiores (alcohol isoteramilico) en los cultivos con *D. hansenii*/*E. thailandicus*, *P. kluyveri*/*W. paramesenteroides*, *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii* y *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*, mientras que, la producción de etil acetato se observó en cultivos con *P. kluyveri*/*W. paramesenteroides*, *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiavzevii* y *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*. En cultivos mixtos con más de dos microorganismos ya sea con levaduras o en combinación con bacterias lácticas, es difícil establecer una tendencia de producción de compuestos volátiles ya que el grado de interacción es compleja.

- Desde el punto de vista de cinética de crecimiento, consumo de sustrato y producción de compuestos volátiles (ésteres, ácido láctico, etc.) se recomienda las cepas de *P. krudiavzevii*, *P. kluyveri* y *W. cibaria*. Con la finalidad de encontrar una aplicación tecnológica de los microorganismos en mención.



## **VIII. RECOMENDACIONES**

Se recomienda el empleo de sistemas API para la identificación de forma preliminar para el estudio de cepas con potencial tecnológico en nichos desconocidos, ya que permite un screening de microorganismos para su futura identificación genética.

Se sugiere profundizar la investigación de las rutas metabólicas de intereses de los microorganismos aislados para su posterior aplicación tecnológica y obtener el mejor aprovechamiento de estos.

Se recomienda evaluar el comportamiento metabólico y fermentativo de los microorganismos estudiados a nivel de laboratorio para determinar los parámetros de cultivo que influyen en la producción de compuestos volátiles de importancia tecnológica.

En base a los resultados obtenidos, de producción de compuestos volátiles de importancia sensorial con cultivos puros y mixtos, se recomienda utilizar cultivos puros con alta capacidad de producción de ésteres mientras que en el caso de cultivos mixtos se recomienda utilizar un menor número de microorganismos.

## IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Braddy S. *Nasua nasua* (South American coati) [Internet]. Animal Diversity Web. [citado el 8 de octubre del 2018]. Disponible en: [https://animaldiversity.org/accounts/Nasua\\_nasua/](https://animaldiversity.org/accounts/Nasua_nasua/)
2. Pereira GVDM, Soccol VT, Brar SK, Neto E, Soccol CR. Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015;57(13):2775–88. doi: 10.1080/10408398.2015.1067759.
3. Gompper ME. Sociality and asociality in white-nosed coatis (*Nasua narica*): foraging costs and benefits. *Behavioral Ecology*. 1996;7(3):254–63. <https://doi.org/10.1093/beheco/7.3.254>
4. Emmons L. *Neotropical Rainforest Mammals; A Field Guide, Second Edition*. Chicago: The University of Chicago Press, 1997.
5. Jaksic FM, Eisenberg JF, Redford KH. Mammals of the Neotropics, Volume 3, the Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. *The Journal of Wildlife Management*. 2001;65(3):598. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2005000200017>
6. Pacheco V, Patterson B, Patton J, Emmons L, Solari S, Ascorra C. LIST OF MAMMAL SPECIES KNOWN TO OCCUR IN MANU BIOSPHERE RESERVE, PERU. *Publ. Mus. Hist. nat. UNMSM (A)*. 1993;44: 1-12.
7. Hirsch BT. Seasonal Variation in the Diet of Ring-Tailed Coatis (*Nasua nasua*) in Iguazu, Argentina. *Journal of Mammalogy*. 2009;90(1):136–43. <https://doi.org/10.1644/08-MAMM-A-050.1>

8. Ferreira GA, Nakano-Oliveira E, Genaro G, Lacerda-Chaves AK. Diet of the coati *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an area of woodland inserted in an urban environment in Brazil. *Revista chilena de historia natural*. 2013;86(1):95–102. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2013000100008>
9. Appel MJG, Gillespie JH. Canine Distemper Virus. *Canine Distemper Virus*. 1972; 11:1–96. DOI:10.1007/978-3-7091-8302-1
10. Denver M. Procyonidae and viverridae. *Zoo and wild Animal Medicine*. Philadelphia: W.B.200;516-23.
11. Herrera H, Lisboa C, Pinho A, Olifiers N, Bianchi R, Rocha F, et al. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102(11):1133–9. DOI: 10.1016/j.trstmh.2008.04.041
12. Cubilla MP, Santos LC, Moraes WD, Cubas ZS, Leutenegger CM, Estrada M, et al. Microscopic and molecular identification of hemotropic mycoplasmas in South American coatis (*Nasua nasua*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2017; 53:19–25. doi: 10.1016/j.cimid.2017.06.004
13. Bittner GC, Hans NR, Neto GH, Moraes MO, Filho GH, Haddad V. Coati (*Nasua nasua*) Attacks on Humans: Case Report. *Wilderness & Environmental Medicine*. 2010;21(4):349–52. doi: 10.1016/j.wem.2010.09.005
14. Vizcarra S. Plan de Negocios para la producción de café de mishasho en la ciudad de Chanchamayo para su exportación al mercado de Estocolmo (Suecia) [Tesis de pregrado]. Universidad Católica Santa María, Arequipa, Perú. 2015 disponible en: <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/2062>
15. Alves-Costa CP, Fonseca GABD, Christófaró C. Variation in The Diet Of The Brown-Nosed Coati (*Nasua Nasua*) In Southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy*. 2004;85(3):478–82. DOI: 10.1644/1383945

16. Hirsch BT, Kays R, Pereira VE, Jansen PA. Directed seed dispersal towards areas with low conspecific tree density by a scatter-hoarding rodent. *Ecology Letters*. 2012Jul;15(12):1423–9. DOI: 10.1111/ele.12000.
17. Linnaeus C. *Genera Plantarum*. 1st ed. Wishoff, Leiden, 1737; coffea p 158
18. Oestreich S. *Comprehensive Natural products* 2. Amburgo(Alemania): Elsevier; 2013. Capítulo 3 Chemistry of Coffe: 1085-1117. 10.1016/B978-008045382-8.00708-5
19. Minagri: informe especial N°001-2013 “Situación del grano de café” 2013-Lima Perú.
20. López M, Nakamine H, Palomino F. “Planeamiento estratégico para la industria peruana del Café”) [Tesis de pregrado]. PUCP, Lima, Perú.2018 disponible en: <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/123456789/12642>
21. Mazzafera P, Baumann TW, Shimizu MM, Silvarolla MB. Decaf and the Steeplechase Towards Decaffito—the Coffee from Caffeine-Free Arabica Plants. *Tropical Plant Biology*. 2009;2(2):63–76. DOI: 10.1007/s12042-009-9032-7
22. Geromel C, Ferreira LP, Guerreiro SMC, Cavalari AA, Pot D, Pereira LFP, Leroy T, Vieira LGE, Mazzafera P, Marraccini P. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *Journal of Experimental Botany*. 2006; 57: 3243–58. DOI: 10.1093/jxb/erl084
23. Clifford M. The Nature of Chlorogenic Acids – Are They Advantageous Compounds in Coffee? *ASIC*. 1997;17: 79–91.
24. Leloup V, Liardon R. Analytical Characterisation of Coffee Carbohydrates. *ASIC* 15e, 1993;15: 861–63
25. Silva CF, Vilela DM, Cordeiro CDS, Duarte WF, Dias DR, Schwan RF. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee

- fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012;29(2):235–47. DOI: 10.1007/s11274-012-1175-2.
- 26 Evangelista SR, Maria Gabriela Da Cruz Pedrozo Miguel, Cordeiro CDS, Silva CF, Pinheiro ACM, Schwan RF. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. *Food Microbiology*. 2014; 44:87–95. DOI: 10.1016/j.fm.2014.05.013
  - 27 Ley R, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh P, Ramey R, Bircher J, Gordon J. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science*. 2008;320(5883): 1647–51. doi: 10.1126/science.1155725
  28. Turner PV. The role of the gut microbiota on animal model reproducibility. *Animal Models and Experimental Medicine*. 2018;1(2):109–15. DOI 10.1002/ame2.12022
  29. Abranches J. Yeast diversity and killer activity dispersed in fecal pellets from marsupials and rodents in a Brazilian tropical habitat mosaic. *FEMS Microbiology Ecology*. 1998;26(1):27–33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb01558.x>.
  - 30 Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LM. Diversity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in feces of herbivores, omnivores and carnivores. *Anaerobe*. 2010;16(6):590–6. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2010.10.005
  31. Zuckerkandl E, Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*. 1965;8(2):357–66. DOI: 10.1016/0022-5193(65)90083-4
  32. Woese C, Stackebrandt E, Macke T, Fox G. A Phylogenetic Definition of the Major Eubacterial Taxa. *Systematic and Applied Microbiology*. 1985;6(2):143–51. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80047-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80047-3)
  33. Obera T. “Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico” *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 15-19. DOI: 10.1016/j.riam.2009.06.001

34. Ray B. Fundamental food microbiology. Third. CRC PRESS, editor. Boca Raton: Taylos and Francis e-Library; 2005: 114-18
35. Kim D, Jeong D, Song K, Seo K. Comparison of traditional and backslopping methods for kefir fermentation based on physicochemical and microbiological characteristics. LWT.2018; 97: 503–07. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.023>
36. Achi O. The potential for upgrading traditional fermented foods through biotechnology. Afr J Biotechnol. 2005a;4(5): 375–80.
37. Tamang JP, Shin D-H, Jung S-J, Chae S-W. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. Frontiers in Microbiology 2016;7: 578 DOI: 10.3389/fmicb.2016.00578.
38. Thakur N, Savithr, and Bhalla, N.C. Characterization of some traditional fermented food and beverages of Himachal Pradesh. Indian J Trad knowl 2004;3(3): 325–35. DOI: 10.1007/s13205-012-0092-2
39. Gobbetti M, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends Food Sci. Technol. 2005; 16:57-69. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.02.013
40. König H. Fröhlich J. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine Geisenheim 1° ed. (Germany) Springer, Charm, 2017. Capítulo 1, Lactic Acid Bacteria. 3–29.
41. Jolly N, Augustyn O, Pretorius I. The role and use of non-saccharomyces yeasts in wine production. South African Journal of Enology & Viticulture. 2006;27(1):15-39. DOI: 10.21548/27-1-1475
42. Escalante W. Perspectives and Uses of Non-Saccharomyces Yeasts in Fermented Beverages. Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages. 2019. DOI: 10.5772/intechopen.81868

43. Estela W, Rychtera M, Melzoch K, Torres-Ibáñez F, Calixto-Cotos R, Bravo-Aranibar N, et al. Efecto de la aireación en la producción de compuestos volátiles por cultivo mixto de *Brettanomyces intermedius* y *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación de sidra. *Tip*. 2014;17(1):5–14. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(14\)70316-X](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(14)70316-X)
44. Anónimo. Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Code of Federal Regulations, 9 CFR Part 304, et al. Office of the Federal Register, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.1996: 61(144):38806–38943.
45. Mossel D., Kleynen-Semmeling C., Vincentie H, Beerens H y Catsaras M.: Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar for selective enumeration of moulds and yeasts in foods and clinical material. *J. Appl. Bact.*1970 33: 454-457 DOI: 10.1111/j.1365-2672. 1970.tb02220. x.
46. Mathot, A, Kihal M, Prevost H y Divies C. Selective enumeration of *Leuconostoc* on Vancomycin agar media. *International Dairy Journal*. 1994: 4(5), 459–469. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)90059-0).
47. Spencer J, Spencer D. *Yeast Protocols. Methods in Molecular Biology* 1st ed. Evans I.H. Humana Press. 2006. Capítulo 1 Isolation and Identification of Yeasts from Natural Habitats. p. 1-4.
48. Coico R. Gram Staining. *Current Protocols in Microbiology*, 2006:00: A.3C.1-A.3C.2. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs00>
49. Bergey D, Holt J. *Leuconostoc*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins, London, 1986a. 2:1071–75.DOI:10.1007/978-3-540-85463-0\_1
50. MacFaddin J. *Catalase-Peroxidase Tests. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*.3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 78-97.

51. Biomeriux . Manual API ID 32 C, Identification system for yeasts REF 32 200 USA, 07990H - xl - 2011
52. Biomeriux . Manual API 50CHL, Lactobacillus and related genera REF 32 200 USA, 07486H - en – 2011.
53. Guía para la presentación de muestras para secuenciación de genomas a través del servicio de secuenciación de genomas individuales de Macrogen, [https://dna.macrogen.com/eng/support/seq/data/Macrogen Single Pass Sequencing Sample Submission Guide spanish](https://dna.macrogen.com/eng/support/seq/data/Macrogen_Single_Pass_Sequencing_Sample_Submission_Guide_spanish).
54. Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman y John A. Smith. Short protocols in molecular biology, third edition, John Wiley & Sons, New York. 2003.
55. Contreras A, Hidalgo C, Schmidt S, Henschke P, Curtin C, Varela C. The application of non-Saccharomyces yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. International Journal of Food Microbiology. 2015; 205:7–15. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027.
56. Mytilinaios I, Salih M, Schofield H, Lambert R. Growth curve prediction from optical density data. International Journal of Food Microbiology. 2012;154(3):169-76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.035>.
57. Bressani A, Martinez S, Evangelista R, Dias D y Schwan. Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. LWT. 2018;92, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.029>
58. Zimbro M, Power D, Miller S., Wilson G, Johnson J, Difco & BBL Manual of Microbiological Culture Media, 2edn., Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, 2009.



59. Ponomarova O, Gabrielli N, Sévin D, Mülleder M, Zirngibl K, Bulyha Et al. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *Cell Systems*, 2017: 5(4), 345–357.e6. doi: 10.1016/j.cels.2017.09.002.
60. Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 1959. 31 p. 426. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
61. Borshchevskaya L, Gordeeva T, Kalinina A, Sineokii S. Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry*. 2016;71(8), 755–58.
62. Norma Técnica Peruana NTP 211.035 Método cromatografico para determinación de compuestos volátiles en vinos. BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de metanol y de congéneres en bebidas alcohólicas y en alcohol etílico empleado en su elaboración, mediante cromatografía de gases.
63. Chopra I. Glycylcyclines: third generation tetracycline antibiotic. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(5):464-9. doi:10.1016/s1471-4892(01)00081-9
64. Watanakunakorn C. Mode of action and in-vitro activity of vancomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1984Jan;14(suppl D):7–18. [https://doi.org/10.1093/jac/14.suppl\\_D.7](https://doi.org/10.1093/jac/14.suppl_D.7)
65. Whittenbury R. Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in the Lactic Acid Bacteria. *Journal of General Microbiology*. 1964;35(1), 13–26. <https://doi.org/10.1099/00221287-35-1-13>
66. Björkroth J, Holzapfel. *The Prokaryotes* 3rd ed. New York(USA): Springer: 2006. Capítulo 9, W. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*; p.267–319. DOI: 10.1007%2F0-387-30744-3\_9

67. Perdigón G, Maldonado C, Valdez J, Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2002;56(S4), 21–26. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601658
68. Gouliamova D, Stoilova-Disheva M, Dimitrov R, Gushterova G, Vasileva-Tonkova, S., Paskaleva A. Preliminary Characterization of Yeasts and Actinomycetes Isolated from Mammalian Feces. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2012: 26(sup1), 1–4. DOI: 10.5504/50YRTIMB.2011.0001
69. Hallen-Adams H. E, Suhr M. J. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*, 2016;8(3), 352–58. doi: 10.1080/21505594.2016.1247140
70. Kurtzman C. Pichia E.C. *The Yeasts*, 2011: 685–707. doi:10.1016/b978-0-444-52149-1.00057-4
71. Milliere J, Mathot A, Schmitt P, Divies C. Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species. *Journal of Applied Bacteriology*. 1989;67(5), 529–542. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb02525.x>
72. Björkroth J, Endo A, y Holzapfel W. The genus *Leuconostoc*. *Lactic Acid Bacteria, Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (2014). 391–404. DOI:10.1002/9781118655252
73. Beasley, S. S., Manninen, T. J. K., & Saris, P. E. J. Lactic acid bacteria isolated from canine faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 2006;101(1), 131–38. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02884.x
74. Nelson, T. M., Rogers, T. L., & Brown, M. V. The Gut Bacterial Community of Mammals from Marine and Terrestrial Habitats. *PLoS ONE*, 2013;8(12), e83655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083655>.
75. Devriese, L. A., Van De Kerckhove, A., Kilpper-Balz, R., & Schleifer, K. H. Characterization and Identification of *Enterococcus* Species Isolated from the

- Intestines of Animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1987, 37(3), 257–59. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00119-Q](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00119-Q)
76. Henning C, Gautam D, Muriana P. Identification of Multiple Bacteriocins in *Enterococcus* spp. Using an *Enterococcus*-Specific Bacteriocin PCR Array. *Microorganisms*, 2015,3(1), 1–16.DOI: 10.3390/microorganisms3010001
  77. Heller, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001:73(2), 374s–379s. doi:10.1093/ajcn/73.2.374s
  78. Jay J,Loessner M, Golden D. “Intrinsic and Extrinsic Parameters of Foods That Affect Microbial Growth. In: *Modern Food Microbiology*. Food Science Text Series. Springer, Boston, MA; 2005 (7)39-59. [https://doi.org/10.1007/0-387-23413-6\\_3](https://doi.org/10.1007/0-387-23413-6_3).
  79. Patel, A., Falck, P., Shah, N., Immerzeel, P., Adlercreutz, P., Stålbrand, H., Nordberg Karlsson, E. Evidence for xylooligosaccharide utilization in *Weissella* strains isolated from Indian fermented foods and vegetables. *FEMS Microbiology Letters*:2013: 346(1), 20–8. DOI: 10.1111/1574-6968.12191
  80. Romano P, Suzzi G, Domizio P, Fatichenti F. Antonie van Leeuwenhoek. Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. *Kluwer Academic Publishers*1997;71(3):239–42. DOI: 10.1023/a:1000102006018
  81. Flores CL, Rodríguez C, Petit T, Gancedo C. Carbohydrate and energy yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000: 24:507-29. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00553.x
  82. Kim S, Kim J, Lee S, Kang K, Kim S, Lee S, et al. Inhibitory effects on N-nitrosodimethylamine formation by decrease of salted-fermented fish products and increase of condiments in kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 2017:26(5), 1447–1455. doi:10.1007/s10068-017-0179-y.

83. Kleerebezem M, Hugenholtz J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*.2003;14(2), 232–37. DOI: 10.1016/s0958-1669(03)00033-8
84. Loviso C. Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. *Revista Argentina de Microbiología*. 2018; 50(4):436-46. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>
85. Ciani M, Comitini F, Mannazzu I. Fermentation. *Encyclopedia of Ecology*. 2008:1548–57.

## X. ANEXOS

### Standard ID



### 16S rRNA service report

Order Number : 180927FN-045

Sample name : Bal\_1\_contig\_1

#### Information

#### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.id
NR_114015.1	Enterococcus thailandicus	1486	1	1486	100	2745	0.0	1486/1486	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Enterococcaceae	Enterococcus	Enterococcus thailandicus

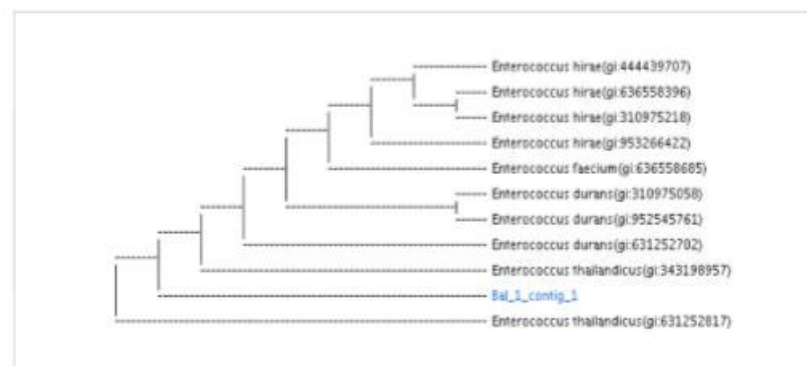


Figura 20. Reporte de la determinación genética de *BAL Enterococcus thailandicus*.

# Standard ID



## 16S rRNA service report

Order Number : 180927FN-045  
Sample name : Bal\_2\_contig\_1

### Information

#### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
LC096224.1	Weissella paramesenteroides	1518	13	1511	98	2748	0.0	1495/1499	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Leuconostocaceae	Weissella	Weissella paramesenteroides

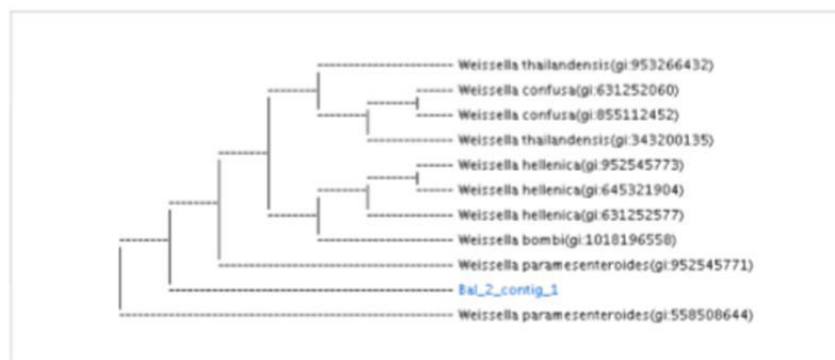


Figura 21. Reporte de la determinación genética de *BAL Weissella paramesenteroides*.

# Standard ID



## 16S rRNA service report

Order Number : 180927FN-045  
Sample name : Bal\_3\_contig\_1

### Information

#### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct. Id
LC098236.1	Weissella cibaria	1516	10	1513	99	2767	0.0	1502/1504	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Leuconostocaceae	Weissella	Weissella cibaria

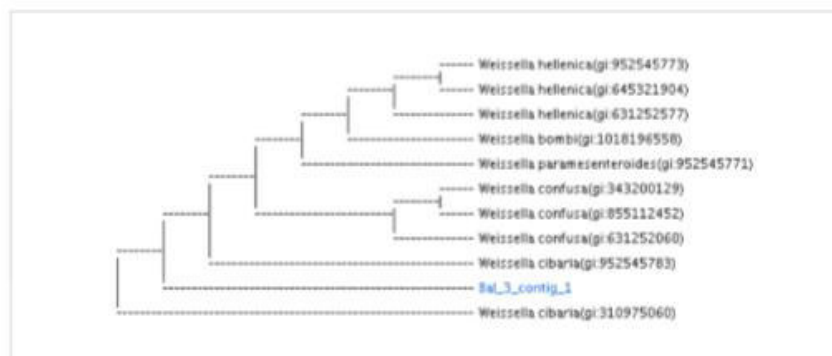


Figura 22. Reporte de la determinación genética de BAL *Weissella cibaria*.

# Standard ID



## 26S rRNA service report

Order Number : 180927FN-045  
Sample name : Lev\_2\_contig\_1

### Information

#### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
LR0R 5'	(ACC CGC TGA ACT TAA GC) 3'	LR0R 5'	(ACC CGC TGA ACT TAA GC) 3'
LR7 5'	(TAC TAC CAC CAA GAT CT) 3'	LR7 5'	(TAC TAC CAC CAA GAT CT) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct. (%)
KR872423.1	Debaryomyces hanseni	1326	1	1326	100	2436	0.0	1324/1326	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Debaryomycetaceae	Debaryomyces	Debaryomyces hanseni

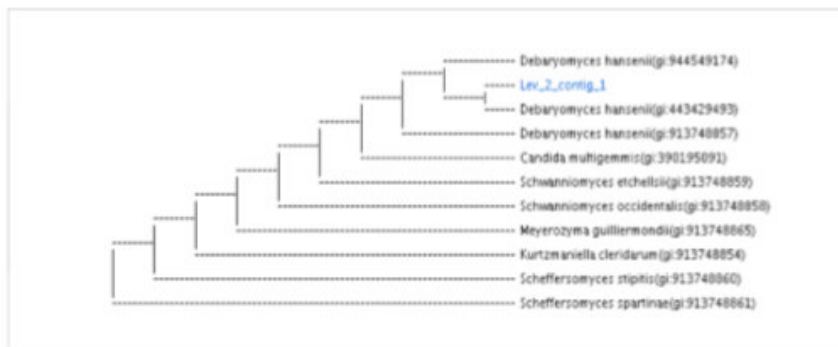


Figura 23. Reporte de la determinación genética de *Debaryomyces hanseni*



# Standard ID



## 26S rRNA service report

Order Number : 180927FN-045  
Sample name : Lev\_3\_contig\_1

### Information

#### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
LRDR 5'	(ACC CGC TGA ACT TAA GC) 3'	LRDR 5'	(ACC CGC TGA ACT TAA GC) 3'
LR7 5'	(TAC TAC CAC CAA GAT CT) 3'	LR7 5'	(TAC TAC CAC CAA GAT CT) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pos./No
NG_055122.1	Pichia kluyveri	3218	11	1335	41	2444	0.0	1324/1325	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	-	Pichia	Pichia kluyveri

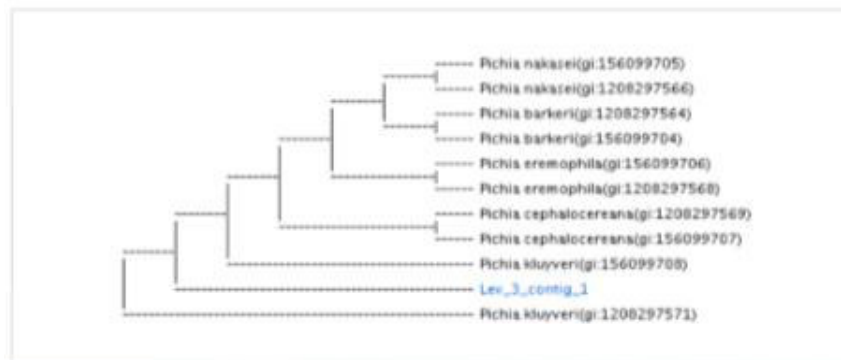


Figura 24. Reporte de la determinación genética de *Pichia kluyveri*

# Standard ID



## 26S rRNA service report

Order Number : 180927FN-045  
Sample name : Lev\_7\_contig\_1

### Information

#### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
LRDR 5'	(ACC CGC TGA ACT TAA GC) 3'	LRDR 5'	(ACC CGC TGA ACT TAA GC) 3'
LR7 5'	(TAC TAC CAC CAA GAT CT) 3'	LR7 5'	(TAC TAC CAC CAA GAT CT) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct. Id.
NG_055104.1	Pichia kudriavzevii	3231	10	1334	41	2447	0.0	1325/1325	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	-	Pichia	Pichia kudriavzevii

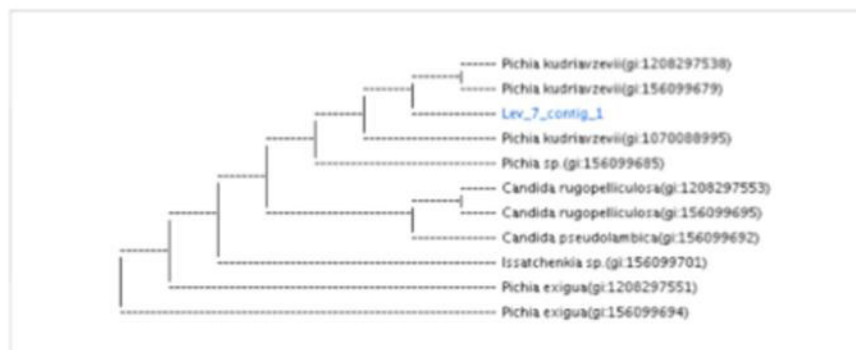


Figura 25. Reporte de la determinación genética de *Pichia kudriavzevii*

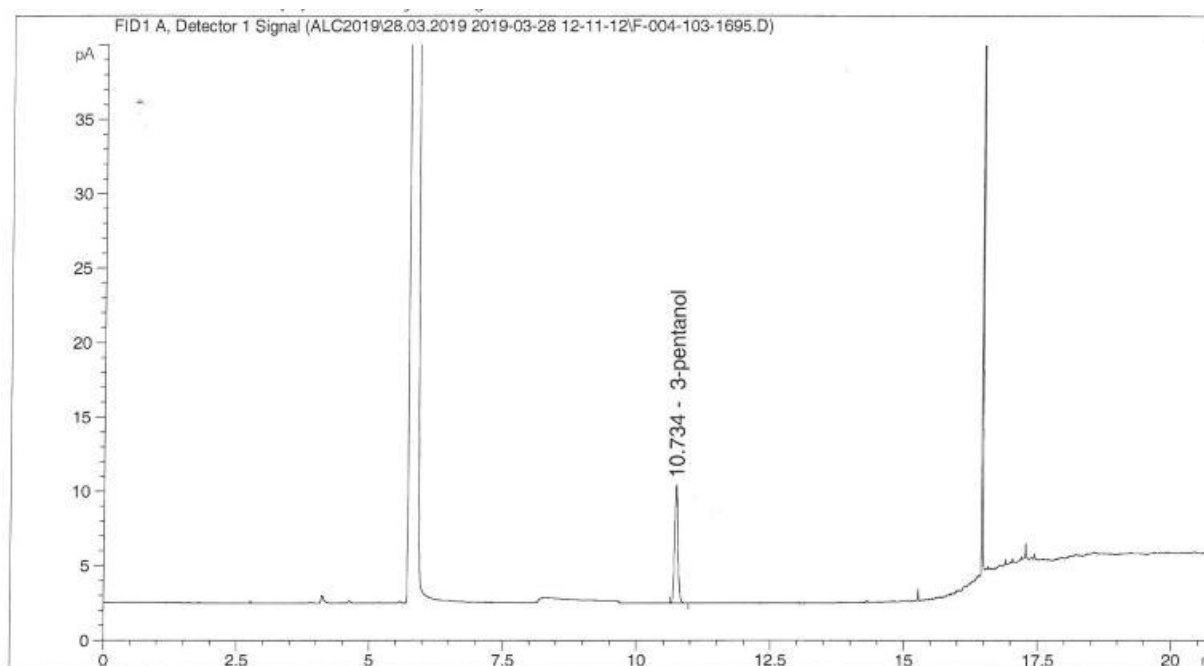


Figura 26. Cromatograma de BAL *Enterococcus thailandicus*.

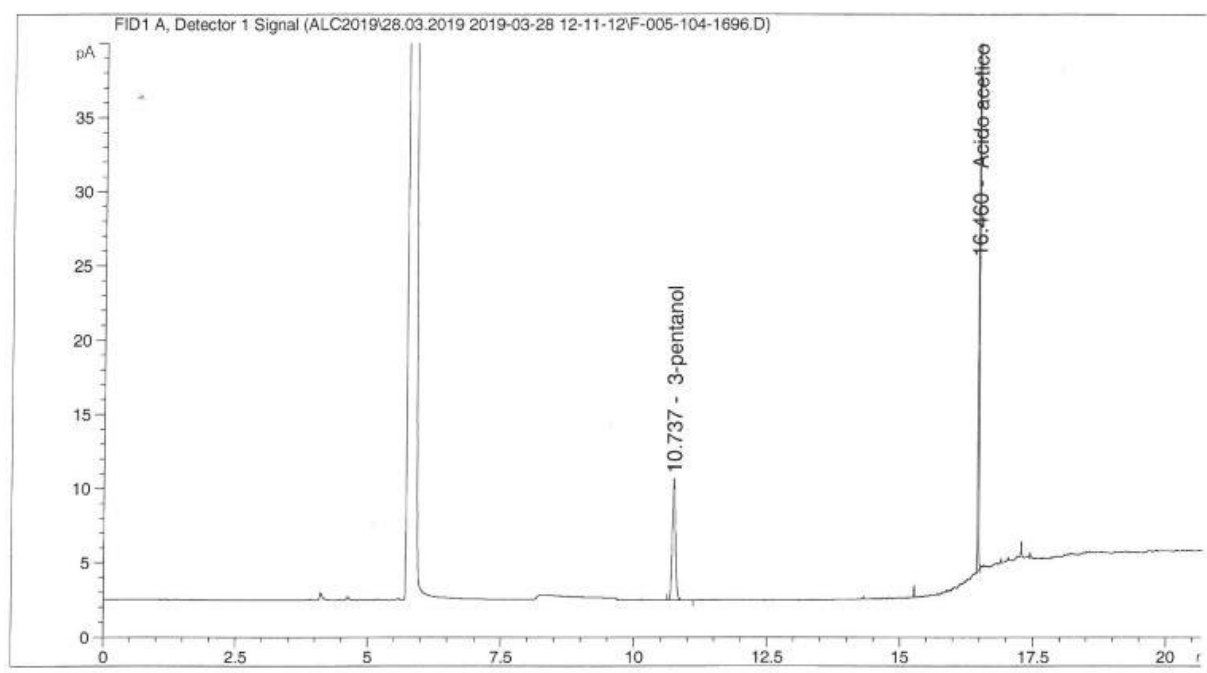


Figura 27. Cromatograma de BAL *Weissella paramesenteroides*.

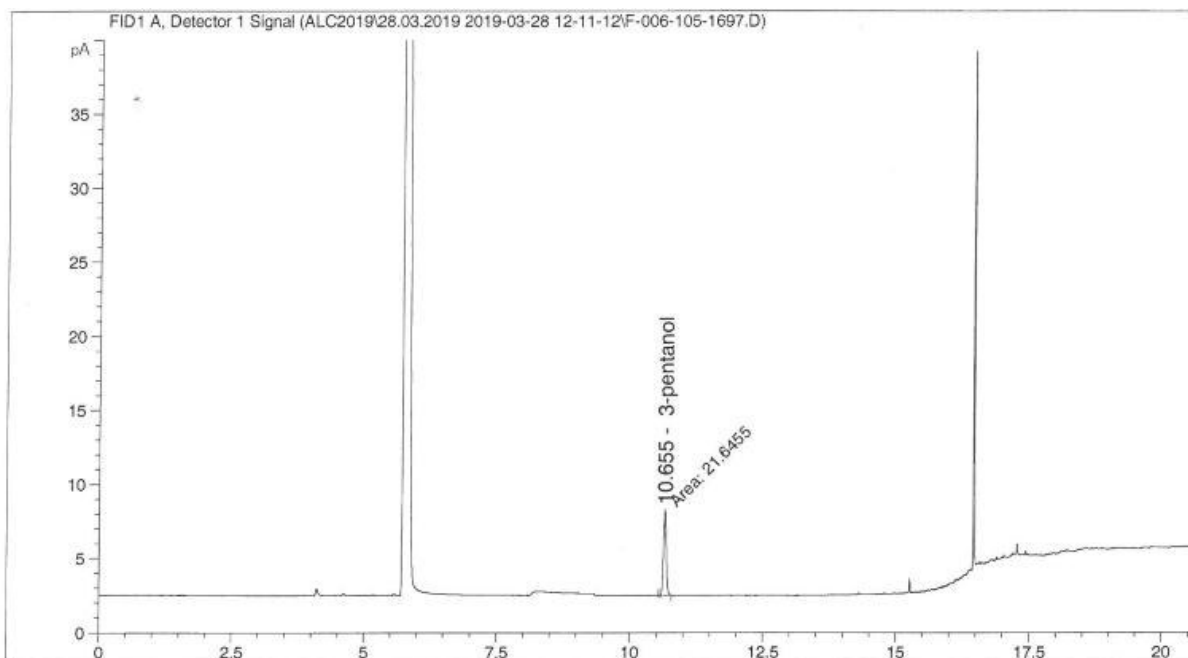


Figura 28. Cromatograma de BAL *Weissella cibaria*

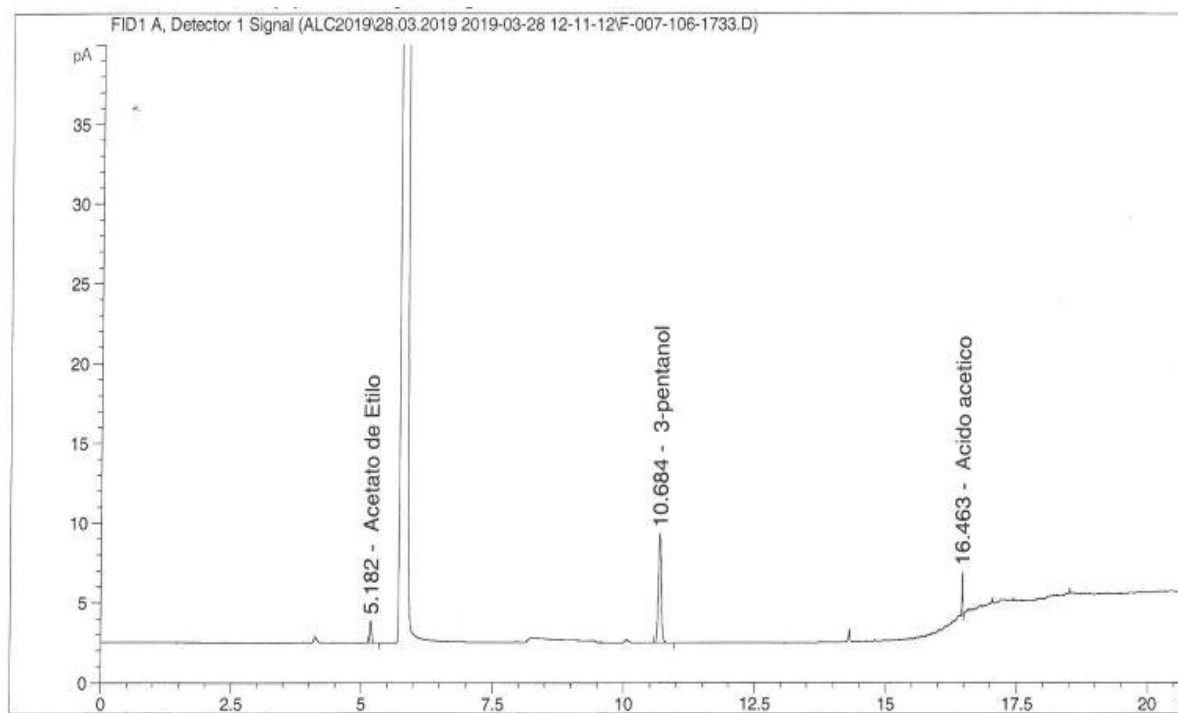


Figura 29. Cromatograma de *Debaryomyces hansenii*

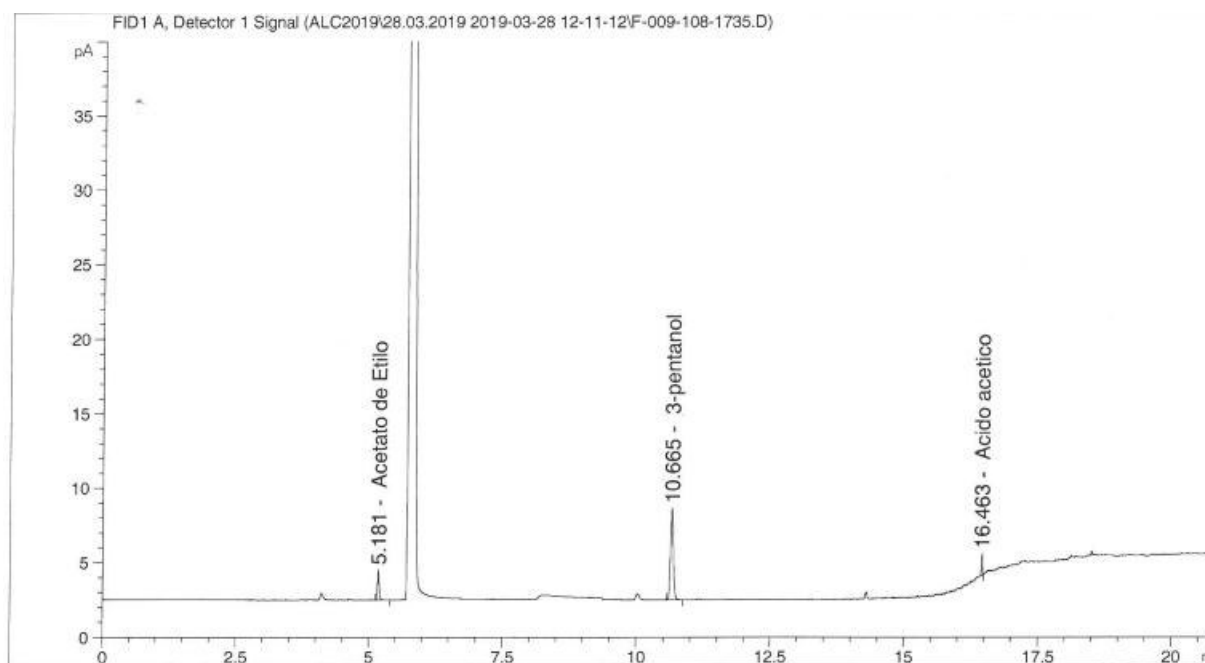


Figura 30. Cromatograma de *Pichia kluyveri*

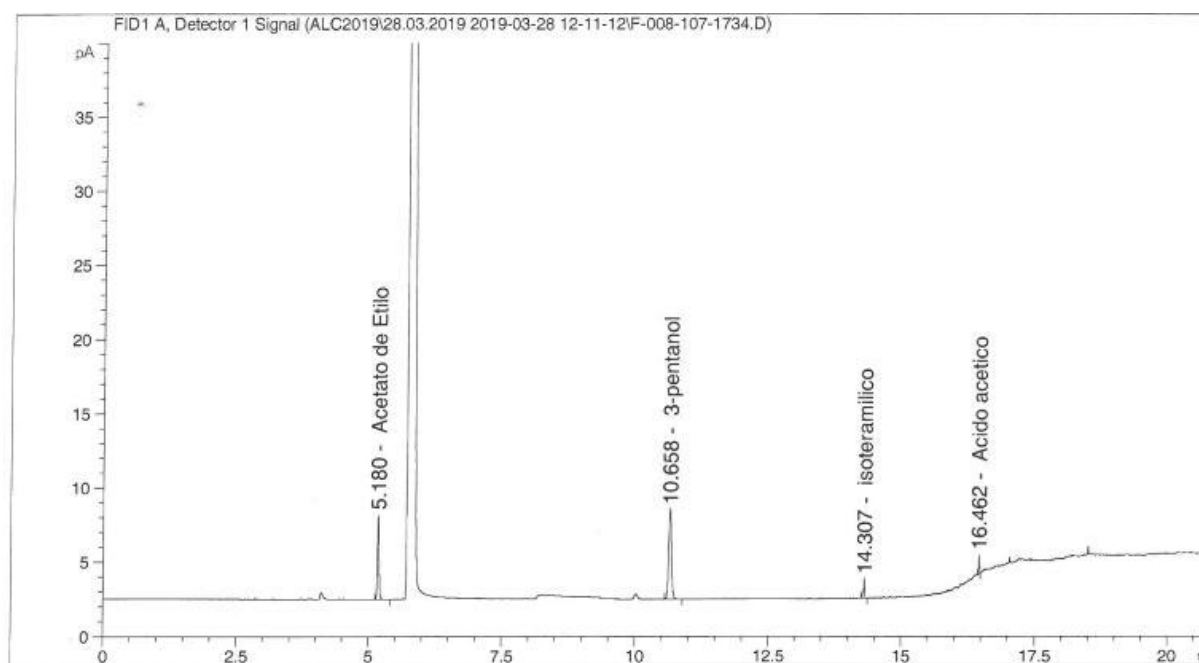


Figura 31. Cromatograma de *Pichia kudriavzevii*

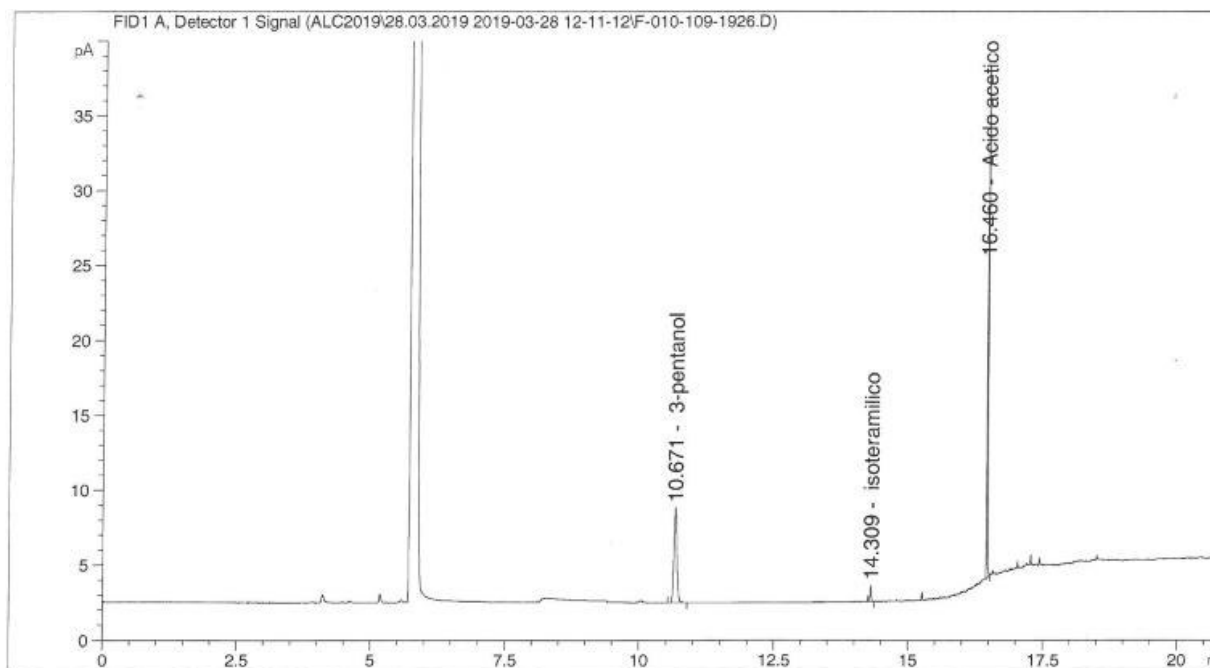


Figura 32. Cromatograma de *D. hansenii*/*E. thailandicus*

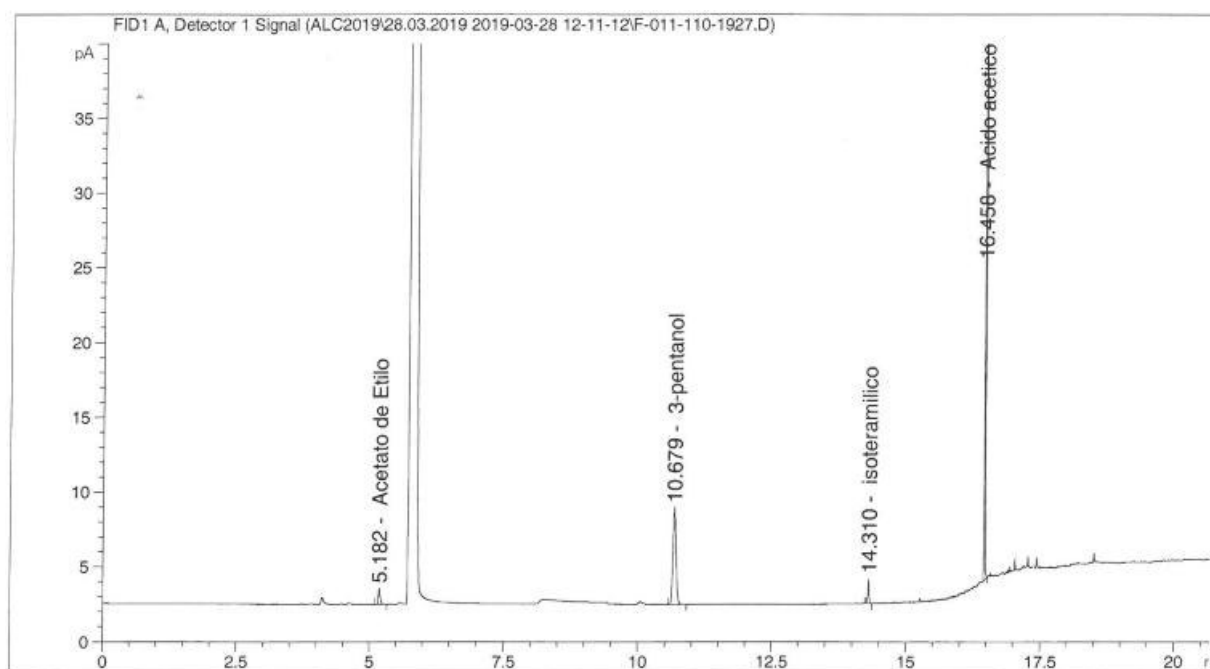


Figura 33. Cromatograma de *P. kluyveri*/*W. paramesenteroides*

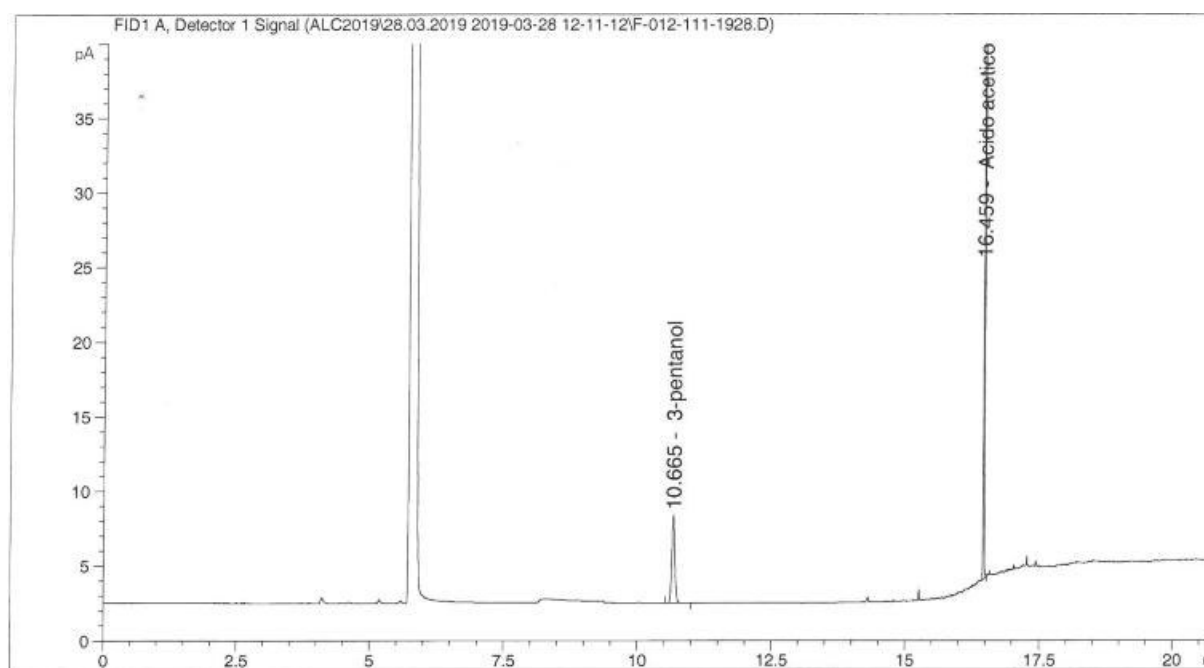


Figura 34. Cromatograma de *W. cibaria*/*P. krudiazzevii*

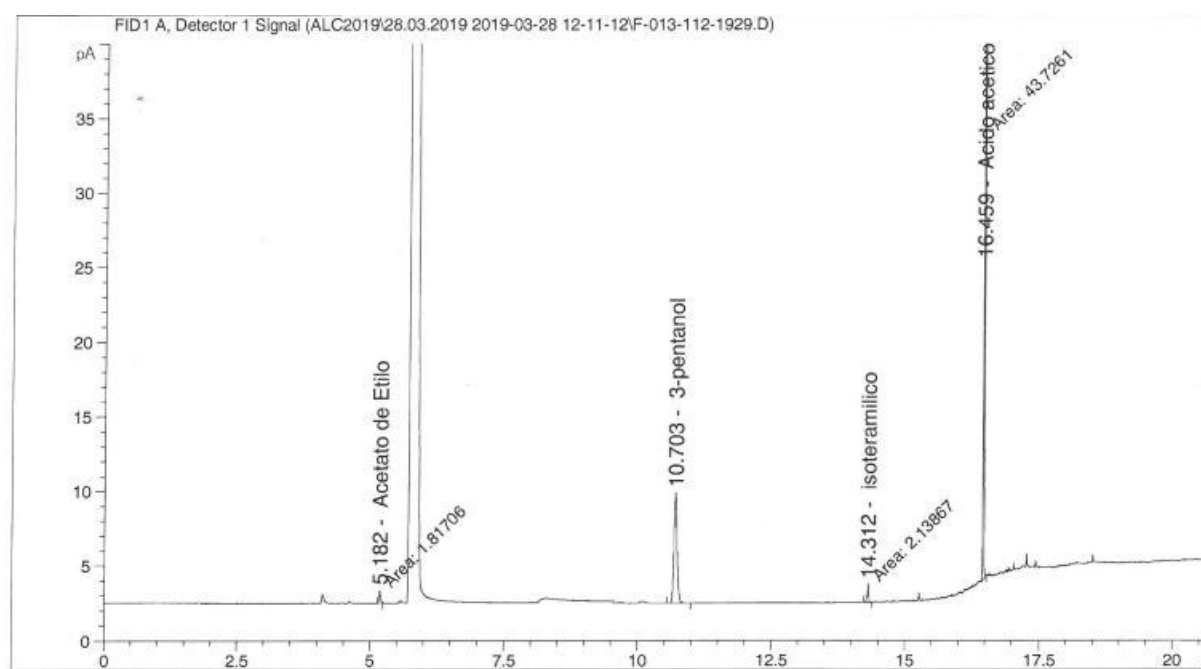


Figura 35. Cromatograma de *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiazzevii*

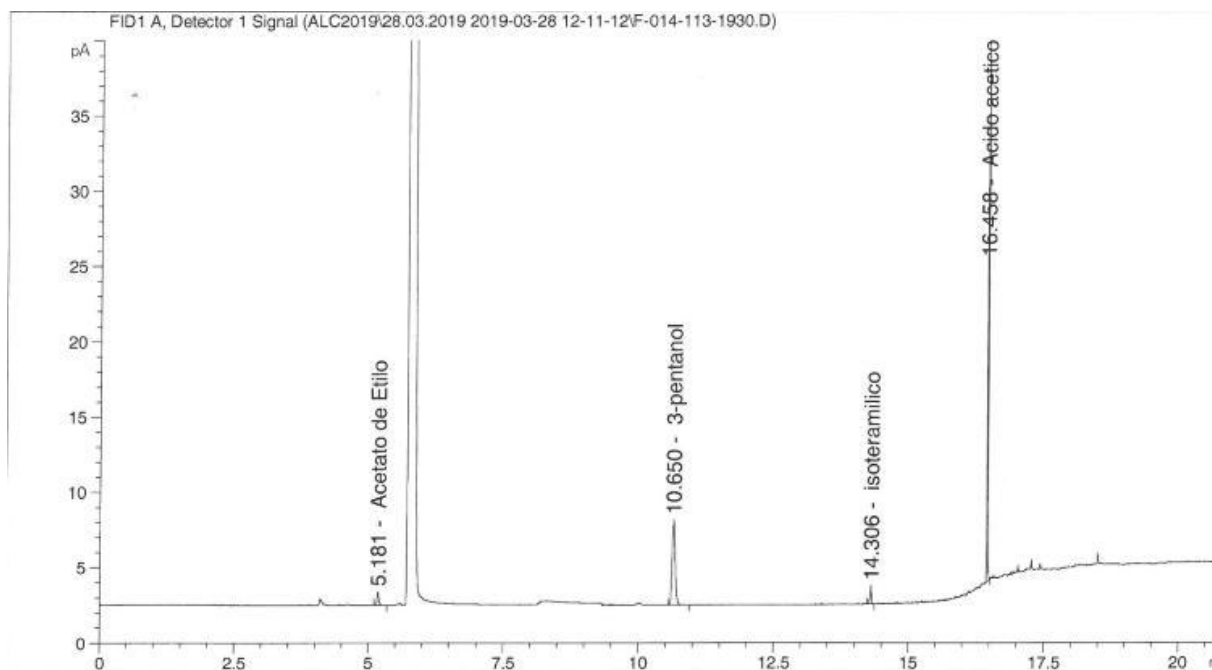


Figura 36. Cromatograma de *E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*

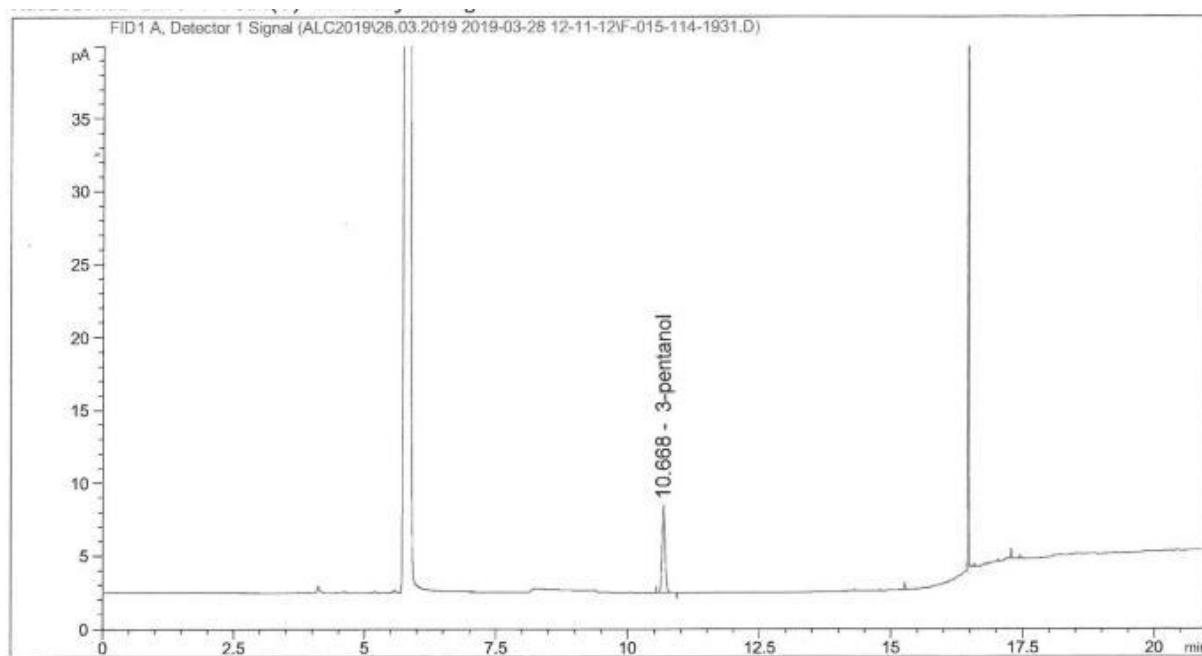


Figura 37. Cromatograma de *D. hansenii*/*P. kluyveri*/*P. krudiazzevii*/*E. thailandicus*/*W. paramesenteroides*/*W. cibaria*.



